

تأثیر گرلین و نانوحامل کیتوزان-آلژینات بر بیان ژن‌های کلیدی محور رشد کپور معمولی

امیرحسین میرشهیدی، بهروز حیدری* و عبدالمجید ولی پور

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۵

چکیده

افزایش بازده رشد در آبی‌پروری از طریق ترکیبات زیست‌فعال مانند پپتیدهای محرک هورمون رشد (GHRPs) یکی از راهکارهای نوین در صنعت شیلات است. در این مطالعه، تأثیر دو پپتید Ghrelin 12 و A-Ghrelin 12 (فرم استیل‌شده) به صورت آزاد و کپسوله‌شده در نانوذرات کیتوزان-آلژینات بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد IGF1، NPY، و GHS-R1a در بچه‌ماهیان کپور معمولی بررسی شد. ابتدا دوز بهینه پپتید (۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم غذا) در یک پیش‌آزمون تعیین گردید. سپس، ماهیان به هفت گروه شامل کنترل، Ghrelin 12 آزاد، A-Ghrelin 12 آزاد، Ghrelin 12 کپسوله‌شده با کیتوزان-آلژینات، Ghrelin 12 کپسوله‌شده با کیتوزان، مخلوط Ghrelin 12 و نانوذرات (بدون کپسوله‌سازی)، و گروه نانوذرات خالی تقسیم شدند. پس از چهار هفته تغذیه، نمونه‌برداری از بافت مغز و کبد انجام شد و بیان ژن‌ها با روش Real-Time PCR سنجش گردید. نتایج نشان داد که پپتیدهای Ghrelin 12 و A-Ghrelin 12 به‌ویژه در فرم کپسوله‌شده، به‌طور معنی‌داری بیان ژن‌های IGF1، NPY، و GHS-R1a را افزایش داده و منجر به بهبود وزن‌گیری و رشد ماهیان شدند. بیشترین تأثیر مربوط به گروه A-Ghrelin 12 کپسوله‌شده با کیتوزان-آلژینات بود که نشان‌دهنده نقش مؤثر نانوحامل در افزایش پایداری و جذب پپتید است. همچنین، پپتید A-Ghrelin 12 عملکردی مشابه یا بهتر از Ghrelin 12 در تحریک رشد نشان داد. این مطالعه اثربخشی استفاده از پپتیدهای محرک رشد همراه با فناوری نانوکپسوله‌سازی را در آبی‌پروری تأیید می‌کند و راه را برای تحقیقات آینده در زمینه بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های زیست‌فعال هموار می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای محرک رشد، نانوکپسوله‌سازی، بیان ژن، کپور معمولی، هورمون رشد

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: bheidari@guilan.ac.ir

مقدمه

صنعت آبی‌پروری به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تأمین پروتئین حیوانی در جهان، نقش کلیدی در امنیت غذایی و اقتصاد بسیاری از کشورها ایفا می‌کند (۱). با افزایش تقاضا برای محصولات آبی و محدودیت منابع طبیعی، بهینه‌سازی روش‌های پرورش و بهبود رشد آبزیان به یک چالش اساسی تبدیل شده است. در این میان، استفاده از ترکیبات زیست‌فعال مانند پپتیدهای محرک هورمون رشد (GHRPs) به عنوان یک راهکار نوین و مؤثر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (۲). این ترکیبات با تحریک ترشح هورمون رشد (GH) و فعال‌سازی محور GH/IGF1، موجب افزایش رشد، بهبود ضریب تبدیل غذایی و تقویت سیستم ایمنی در ماهیان می‌شوند (۳).

هورمون رشد به عنوان یک عامل آنابولیک قوی، نقش محوری در تنظیم متابولیسم، رشد و توسعه بافت‌های مختلف بدن ایفا می‌کند (۴). با این حال، استفاده مستقیم از هورمون رشد در آبی‌پروری به دلایل اقتصادی و فنی چالش‌برانگیز است. از این رو، پپتیدهای محرک ترشح هورمون رشد، مانند گرلین، به عنوان جایگزین‌های مؤثر معرفی شده‌اند (۵). گرلین با اتصال به گیرنده‌های خاص مانند GHS-R1، موجب تحریک ترشح هورمون رشد از هیپوفیز می‌شوند (۶). مطالعات نشان داده‌اند که گرلین نه تنها

باعث افزایش ترشح هورمون رشد می‌شود، بلکه از طریق تأثیر بر بیان ژن‌های کلیدی مانند IGF1، NPY و GHS-R1a، رشد و اشتها را در ماهیان بهبود می‌بخشد (۷).

در این مطالعه، تمرکز اصلی بر ارزیابی بیان ژن فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (Insulin-like growth factor 1) یا IGF1 در کبد به عنوان شاخص نهایی فعال‌سازی محور رشد قرار گرفت. IGF1 یک میانجی کلیدی در اثرات آنابولیک هورمون رشد است که به‌طور مستقیم تحریک رشد سوماتیک را بر عهده دارد (۸). علاوه بر این، به منظور درک جامع‌تر از مکانیسم عمل گرلین در سطح سیستم مرکزی، بیان ژن نوروپپتید Y یا NPY در مغز نیز مورد بررسی قرار گرفت. NPY یک محرک قدرتمند مرکزی اشتها است و افزایش بیان آن می‌تواند منجر به تحریک تغذیه و افزایش مصرف غذا شود که به‌طور غیرمستقیم به بهبود رشد می‌انجامد (۷). در نهایت، سطح بیان ژن گیرنده گرلین Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a یا GHS-R1a نیز ارزیابی شد تا پاسخ مستقیم سیستم به لیگاند تیمار شده مورد سنجش قرار گیرد (۹).

یکی از چالش‌های استفاده از پپتیدها در آبی‌پروری، پایداری کم و جذب محدود آن‌ها در دستگاه گوارش است برای غلبه بر این محدودیت، فناوری نانوکپسوله‌سازی با استفاده از پلیمرهای زیست‌سازگار مانند کیتوزان و آلژینات مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). کیتوزان به دلیل خواص منحصر به فردی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و توانایی اتصال به مخاط روده، به عنوان یک نانوحامل ایده‌آل برای رهایش کنترل‌شده پپتیدها شناخته می‌شود (۱۱). از سوی دیگر، آلژینات با تشکیل یک لایه محافظ در اطراف نانوذرات، از تخریب پپتیدها در محیط اسیدی معده جلوگیری می‌کند (۱۰). ترکیب این دو پلیمر در قالب نانوذرات هیبریدی، می‌تواند کارایی پپتیدها را به‌طور چشمگیری افزایش دهد.

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به دلیل اهمیت اقتصادی و سازگاری با شرایط پرورش متراکم، به عنوان یک مدل مناسب برای مطالعات آبی‌پروری شناخته می‌شود (۱۲). این گونه به‌ویژه در کشورهای ایران که دارای منابع آبی محدود هستند، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. با این حال، بهبود رشد و بازده تولید در این ماهی همواره یکی از دغدغه‌های اصلی پرورش‌دهندگان بوده است. از این رو، استفاده از ترکیبات محرک رشد مانند پپتیدهای GHRP می‌تواند راهکاری عملی برای دستیابی به این هدف باشد.

گرلین به دلیل توانایی در تحریک ترشح هورمون رشد و بهبود رشد در آبزیان، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۵). مطالعات نشان داده‌اند که این پپتیدها با تقلید عملکرد گرلین و اتصال به گیرنده‌های GHS-R1a، نه تنها ترشح هورمون رشد را افزایش می‌دهند، بلکه از طریق تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با رشد مانند IGF1 و NPY، موجب بهبود متابولیسم و افزایش وزن در ماهیان می‌شوند (۱۳). با این حال، چالش اصلی در استفاده از این پپتیدها، پایداری کم و تخریب سریع آن‌ها در دستگاه گوارش است که کارایی آن‌ها را محدود می‌کند (۱۴).

با وجود مطالعات کم در مورد تأثیر گرلین بر رشد آبزیان، همچنین تحقیقات کمی در مورد بهینه‌سازی فرمولاسیون این پپتیدها با استفاده از فناوری نانوکپسوله‌سازی انجام شده است (۱۳). همچنین، بیشتر پژوهش‌های پیشین بر روی گونه‌های خاص مانند تیلاپیا و میگو متمرکز بوده‌اند، در حالی که اطلاعات محدودی در مورد تأثیر این پپتیدها بر ماهی کپور معمولی، به‌ویژه در سطح مولکولی (بیان ژن‌های کلیدی رشد) وجود دارد (۱). از سوی دیگر، طراحی با ساختار اصلاح‌شده (مانند گرلین استیل‌شده) و مقایسه کارایی آن‌ها با گرلین طبیعی نیز کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش با ترکیب نانوفناوری و زیست‌فناوری، به دنبال پر کردن این شکاف دانشی است و می‌تواند راهکارهای جدیدی برای بهبود رشد در صنعت آبی‌پروری ارائه دهد.

گرلین، به عنوان یک پپتید محرک ترشح هورمون رشد، در میان گونه‌های مختلف ماهیان شناسایی و توالی‌یابی شده است. یکی از آنالوگ‌های مؤثر و مورد مطالعه، پپتید گرلین-۱۲ مشتق شده از ماهی قرمز (*Carassius auratus*) با توالی آمینواسیدی GTSFLSPAQKPQ است. این پپتید با اتصال به گیرنده‌های GHS-R1a، به عنوان یک محرک قوی برای ترشح هورمون رشد از هیپوفیز عمل می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از این پپتید می‌تواند منجر به بهبود عملکرد رشد، کارایی تغذیه و سنتز پروتئین در گونه‌های مختلف آبی شود. با این حال، مشابه سایر پپتیدها، کاربرد عملی آن با چالش‌هایی مانند نیمه‌عمر کوتاه و تخریب سریع در دستگاه گوارش مواجه است (۱۳).

در این راستا، مطالعه حاضر به بررسی تأثیر دو گرلین Ghrelin 12 و A-Ghrelin 12 در فرم‌های آزاد و نانوکپسوله شده با کیتوزان-آلژینات بر بیان ژن‌های کلیدی محور رشد در ماهی کپور معمولی پرداخته است. A-Ghrelin 12 با استیل‌کردن Ghrelin 12 طراحی شده است تا پایداری و میل اتصال به گیرنده را افزایش دهد. همچنین، استفاده از نانوذرات کیتوزان-آلژینات به عنوان حامل، با هدف بهبود پایداری، جذب و ره‌ایش کنترل‌شده گرلین صورت گرفته است. این پژوهش با ترکیب دانش بیوتکنولوژی، نانوفناوری و آبی‌پروری، گامی نوین در جهت توسعه روش‌های مؤثر برای بهبود رشد در صنعت آبی‌پروری محسوب می‌شود. این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر گرلین و نانوکپسوله‌سازی آن بر بیان ژن‌های IGF1، NPY و GHS-R1a در ماهی کپور معمولی انجام شده است. همچنین، تأثیر این ترکیبات بر پارامترهای رشد مانند افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز توسعه روش‌های نوین در آبی‌پروری و کاهش هزینه‌های تولید باشد.

مواد و روشها

این پژوهش به منظور بررسی تأثیر گرلین‌های محرک هورمون رشد و نانوحامل‌های پلیمری بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد در ماهی کپور معمولی انجام شد. در ادامه جزئیات روش‌های مورد استفاده شرح داده می‌شود.

پیش‌آزمون تعیین دوز بهینه پپتید

پیش از آغاز آزمایش اصلی، یک مطالعه مقدماتی به منظور تعیین غلظت مؤثر Ghrelin 12 انجام شد. در این مرحله، ۱۵۰ عدد بچه ماهی کپور (میانگین وزن 0.8 ± 0.08 گرم) به پنج گروه شامل کنترل (بدون گرلین) و چهار گروه تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم گرلین بر کیلوگرم غذا تقسیم شدند. پس از دو هفته تغذیه، نمونه‌برداری از بافت کبد انجام و بیان ژن IGF1 به عنوان شاخص کلیدی رشد با روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد (۱۳).

تهیه و نگهداری ماهی‌ها

در این مطالعه از ۱۵۰ عدد بچه ماهی کپور معمولی با (میانگین وزن 0.8 ± 0.08 گرم) استفاده شد. ماهی‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، به مدت یک هفته در شرایط استاندارد (دمای ۱۹ درجه سانتی‌گراد، pH ۷.۶ و اکسیژن محلول ۸.۴ میلی‌گرم در لیتر) نگهداری شدند تا با محیط جدید سازگار شوند. در این دوره، ماهی‌ها با غذای تجاری گیلک دانه تغذیه شدند (۱۵).

طراحی آزمایش و گروه‌بندی

ماهی‌ها به هفت گروه مختلف تقسیم شدند که شامل گروه کنترل (بدون گرلین)، گروه‌های دریافت‌کننده Ghrelin 12 و A-Ghrelin 12 به صورت آزاد، گروه‌های دریافت‌کننده Ghrelin 12 به فرم نانوکپسوله شده با کیتوزان و کیتوزان-آلژینات، گروه

مخلوط گرلین و نانوذرات (بدون کپسوله‌سازی) و گروه نانوذرات خالی بود. هر گروه شامل سه تکرار و هر تکرار حاوی ۱۰ ماهی بود. تیمارها عبارتند از:

کنترل (غذای معمولی بدون گرلین)

Ghrelin 12 آزاد (۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم غذا)

A-Ghrelin 12 آزاد (گرلین ۱۲ استیل‌شده)

Ghrelin 12 کپسوله‌شده با کیتوزان-آلژینات

Ghrelin 12 کپسوله‌شده با کیتوزان

مخلوط Ghrelin 12 و نانوذرات (بدون کپسوله‌سازی)

نانوذرات خالی (بدون گرلین)

تهیه غذاهای حاوی پپتید

گرلین در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم غذا به غذای ماهی اضافه شدند. برای این منظور، ابتدا غذا با آب مقطر مخلوط شده و به صورت خمیر درآمد. سپس گرلین به این مخلوط اضافه شد و پس از همگن شدن، غذا در دمای محیط خشک شد. غذاهای آماده شده در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

سنتز و خالص‌سازی گرلین

Ghrelin 12 (GTSFLSPAQKPQ) به روش سنتز فاز جامد تولید شد. A-Ghrelin 12 (Ac-GTSFLSPAQKPQ) نیز که یک آنالوگ با اصلاح ساختاری بود، با همان روش سنتز شد. خالص‌سازی پپتیدها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام گرفت و خلوص نهایی آن‌ها بیش از ۹۵ درصد تأیید شد (۱۶).

تهیه نانوذرات حامل

نانوذرات کیتوزان با استفاده از روش یون ژل (ionotropic gelation) تهیه شدند. ابتدا محلول کیتوزان (با وزن مولکولی متوسط و درجه استیل‌زدایی $\leq 75\%$) به غلظت ۰,۱ (w/v) % در بافر استات سدیم ۰,۱ مولار، pH=5.2 تهیه و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط و تحت همزن مغناطیسی (۱۰۰۰ دور در دقیقه) قرار داده شد. سپس محلول تری پلی فسفات سدیم ۰,۱ (w/v) % (TPP) به صورت قطره‌قطره و با نسبت حجمی ۱:۵ به محلول کیتوزان اضافه گردید. تشکیل نانوذرات با ایجاد کدورت در محلول قابل مشاهده بود.

برای تهیه نانوذرات کیتوزان-آلژینات، پس از تشکیل اولیه نانوذرات کیتوزان، محلول آلژینات سدیم ۰,۴۵ (w/v) % به سیستم اضافه شد. در مورد نمونه‌های حاوی پپتید، پپتیدهای Ghrelin 12 با غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مرحله قبل از اضافه کردن TPP به محلول کیتوزان افزوده شدند. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت دیگر هم زده شد تا اطمینان حاصل شود که پپتیدها به طور کامل در ماتریکس نانوذرات محصور شده‌اند.

سوسپانسیون نهایی نانوذرات به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و با دور ۶۰۰۰x سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل پس از شستشو با آب مقطر استریل، به دستگاه فریز درایر منتقل و به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. پودر نانوذرات حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری گردید (۱۰).

نمونه‌برداری و آنالیزهای مولکولی

پس از پایان دوره آزمایش (۴ هفته)، ماهی‌ها به مدت ۲ ساعت ناشتا شده و سپس با استفاده از عصاره گل میخک (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۳ دقیقه، بی‌هوش شدند. وزن نهایی هر ماهی ثبت گردید و سپس نمونه‌برداری از بافت‌های مغز و کبد با استفاده از ابزار استریل انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای استخراج RNA کل، از روش ترايزول استفاده شد. حدود ۳۰ میلی‌گرم از هر بافت در هاون پر از نیتروژن مایع به پودر تبدیل شده و با ۵۰۰ میکرولیتر ترايزول هموژنیزه شد. پس از افزودن کلروفرم و سانتریفیوژ، فاز آبی حاوی RNA با ایزوپروپانول رسوب داده شد. رسوب RNA با اتانول ۷۵٪ شسته شده و در آب DEPC-treated حل گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. نمونه‌هایی با نسبت OD260/280 بین ۱٫۸-۲٫۰ و نشانه‌های واضح باندهای S ۲۸ و S ۱۸ برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم RNA و کیت cDNA سازی تجاری انجام گرفت. ابتدا با الیگو dT و dNTP مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس مخلوط واکنش حاوی بافر X5، RNase inhibitor، آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس و آب DEPC-treated تهیه و به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. فعالیت آنزیم با حرارت دهی در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه متوقف شد.

بررسی بیان ژن‌های هدف JGFI، NPY، GHS-R1a و ژن (β -actin) با روش Real-Time PCR و با استفاده از سیستم SYBR Green انجام شد. پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن طراحی شدند (جدول ۱). واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش SYBR Green، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر ۱۰ میکرولیتر بر پیکومول، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده و ۷ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز انجام گرفت. شرایط چرخه‌های حرارتی شامل مرحله اولیه دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. در پایان هر واکنش، منحنی ذوب برای تأیید اختصاصیت محصولات PCR تهیه شد (۱۴).

داده‌های بیان ژن با روش $\Delta\Delta Ct$ تحلیل شدند. ابتدا تفاوت بین Ct ژن هدف و ژن خانه‌دار (ΔCt) برای هر نمونه محاسبه شد. سپس تفاوت ΔCt نمونه‌های تیمار شده با ΔCt نمونه کنترل ($\Delta\Delta Ct$) تعیین گردید. میزان تغییرات بیان ژن با فرمول $(\Delta\Delta Ct)^{-1}$ محاسبه شد.

آنالیزهای آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد تحلیل قرار گرفتند. پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، از آزمون ANOVA یک طرفه برای مقایسه میانگین گروه‌ها استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار، از آزمون تعقیبی دانکن برای مقایسه دو به دو گروه‌ها استفاده گردید. سطح معنی‌داری در تمامی آزمون‌ها ۰,۰۵ در نظر گرفته شد.

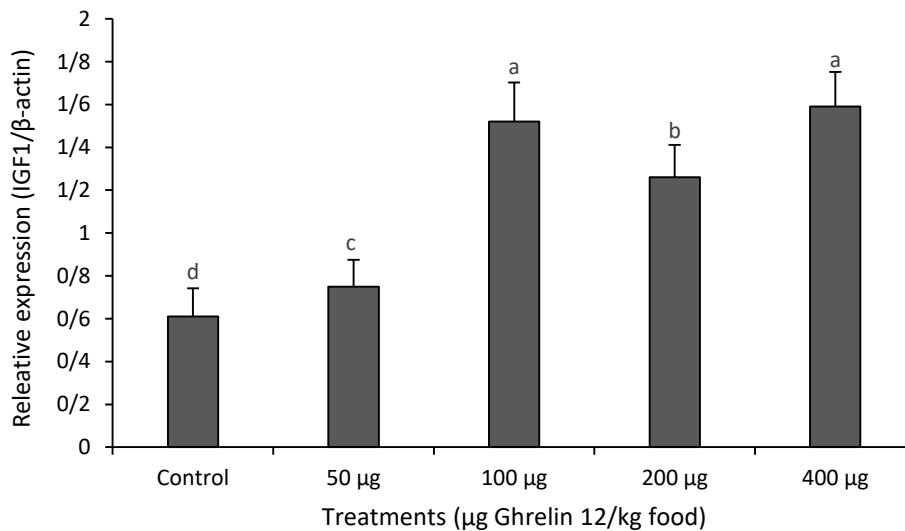
نتایج

پیش‌آزمون

نتایج نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) باعث افزایش بیان IGF1 شدند، اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین این دو غلظت مشاهده نشد. همچنین، ارزیابی پارامترهای رشد نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم Ghrelin 12 بیشترین کارایی را دارد. بر این اساس، این غلظت به عنوان دوز بهینه برای آزمایش اصلی انتخاب شد تا از اتلاف ماده مؤثر و احتمال اثرات منفی ناشی از دوزهای بالا جلوگیری شود.

بیان ژن IGF1 کبدی

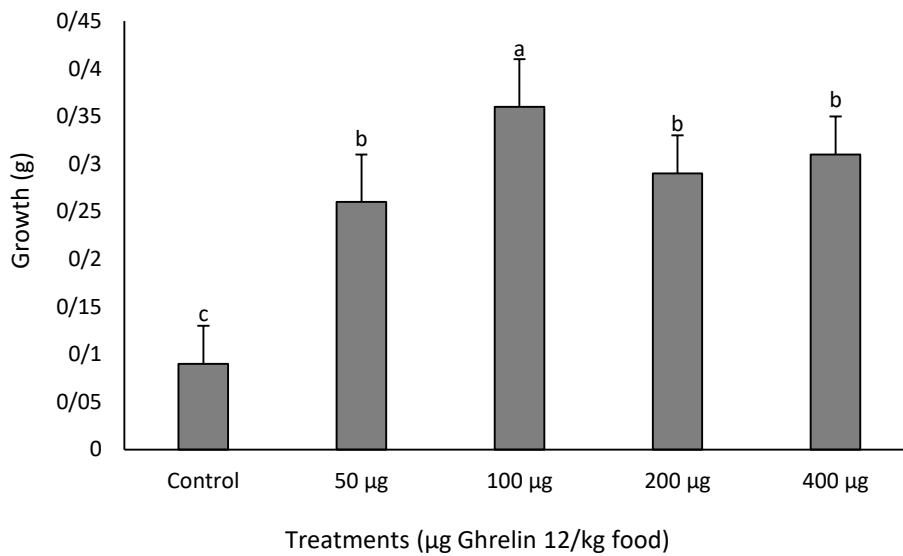
میزان بیان ژن IGF1 در غلظت‌های مختلف Ghrelin 12 تغییرات معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). بیشترین میزان بیان این ژن در دوز ۴۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم در یک کیلوگرم غذا مشاهده شد ($p < 0/05$).



شکل ۱- تغییرات بیان ژن IGF1 تحت تیمار غلظت‌های مختلف Ghrelin 12 در بچه ماهی کپور معمولی. حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

افزایش وزن بچه ماهی‌ها

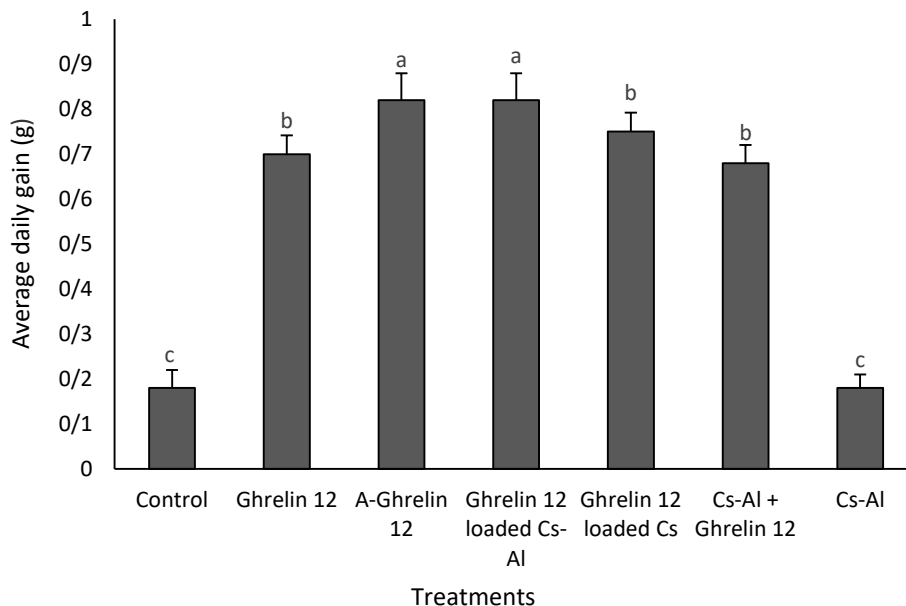
وزن گیری بچه ماهی‌ها در غلظت‌های مختلف Ghrelin 12 تفاوت چشم‌گیری داشت ($p < 0/05$). بچه ماهی‌ها بیشترین وزن گیری را در تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم Ghrelin 12 در یک کیلوگرم غذا داشتند ($p < 0/05$).



شکل ۲- تغییرات وزن گیری تحت تیمار غلظت‌های مختلف Ghrelin 12 در بچه ماهی کپور معمولی. حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

افزایش وزن بچه ماهی‌ها

میانگین وزن گیری روزانه در تیمارهایی که گرلین دریافت کرده بودند به صورت چشمگیری از گروه‌هایی که گرلین دریافت نکرده بودند بیشتر است ($p < 0.05$). بیشترین میزان میانگین وزن گیری روزانه در تیمارهای A-Ghrelin 12 و Ghrelin 12 loaded Cs-Al مشاهده شد و کمترین میزان آن در تیمار کنترل و تیماری که فقط آلژینات و کیتوزان دریافت کرده بودند مشاهده شد.

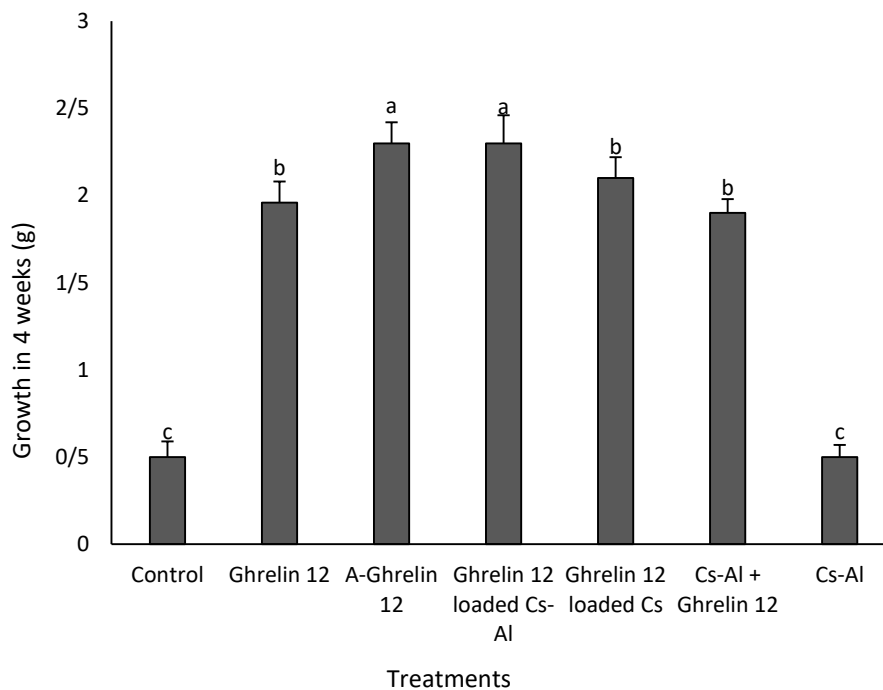


شکل ۳- میانگین وزن گیری روزانه تحت تیمار غلظت‌های مختلف گرلین در بچه ماهی کپور معمولی. حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد. گروه شاهد (Control). گروهی که گرلین اصلی را به همراه غذا دریافت کردند (Ghrelin 12). گروهی که

گرلین استیل را به همراه غذا دریافت کردند (A-Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله شده توسط نانوذرات آلژینات-کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs-Al loaded Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله شده توسط نانوذرات کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs loaded Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله نشده به همراه نانوذرات آلژینات-کیتوزان را با غذا دریافت کردند (Cs-Al + Ghrelin 12). گروهی که نانوذرات آلژینات-کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs-Al). تمام داده‌ها به همراه انحراف معیار \pm SD بیان شده‌اند ($n = 9$).

رشد بچه ماهی‌ها

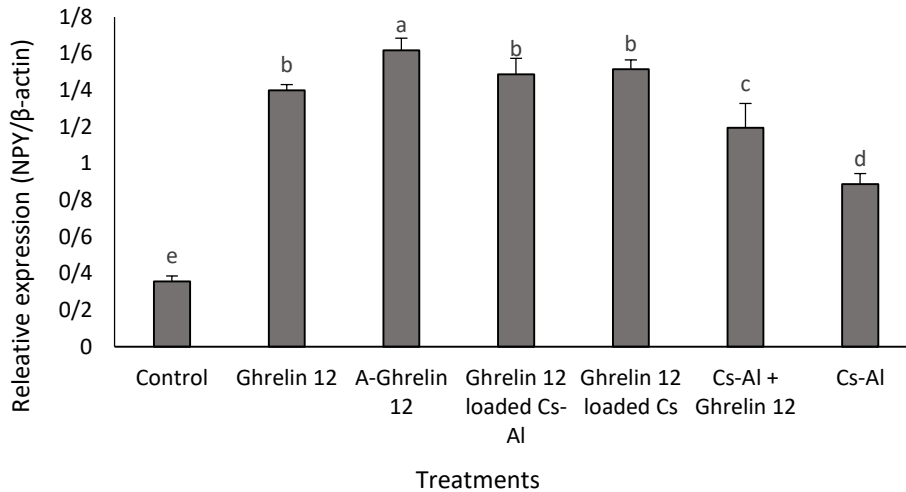
میانگین رشد ۴ هفته‌ای در تیمارهایی که گرلین دریافت کرده بودند به صورت چشمگیری از گروه‌هایی که گرلین دریافت نکرده بودند بیشتر است ($p < 0.05$). بیشترین میزان میانگین رشد ۴ هفته‌ای در تیمارهای A-Ghrelin 12 و Ghrelin 12 loaded Cs-Al مشاهده شد و کمترین میزان آن در تیمار کنترل و تیماری که فقط آلژینات و کیتوزان دریافت کرده بودند مشاهده شد.



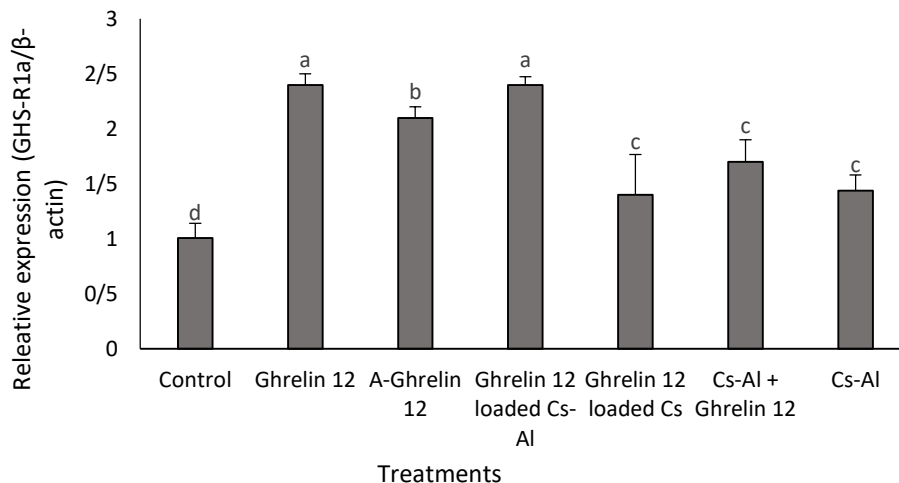
شکل ۴- میانگین رشد ۴ هفته‌ای تحت تیمار غلظت‌های مختلف گرلین در بچه ماهی کپور معمولی. حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد. گروه شاهد (Control). گروهی که گرلین اصلی را به همراه غذا دریافت کردند (Ghrelin 12). گروهی که گرلین استیل را به همراه غذا دریافت کردند (A-Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله شده توسط نانوذرات آلژینات-کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs-Al loaded Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله شده توسط نانوذرات کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs loaded Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله نشده به همراه نانوذرات آلژینات-کیتوزان را با غذا دریافت کردند (Cs-Al + Ghrelin 12). گروهی که نانوذرات آلژینات-کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs-Al). تمام داده‌ها به همراه انحراف معیار \pm SD بیان شده‌اند ($n = 9$).

تغییرات بیان ژن NPY

میزان بیان ژن NPY در تیمارهایی که گرلین دریافت کرده بودند به صورت چشمگیری از گروه‌هایی که گرلین دریافت نکرده بودند بیشتر است ($p < 0.05$). بیشترین میزان بیان ژن NPY در تیمار A-Ghrelin 12 مشاهده شد و کمترین میزان آن در گروه کنترل مشاهده شد.



شکل ۵- تغییرات بیان ژن NPY تحت تیمار غلظت‌های مختلف گرلین در بچه ماهی کپور معمولی. حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد. گروه شاهد (Control). گروهی که گرلین اصلی را به همراه غذا دریافت کردند (Ghrelin 12). گروهی که گرلین استیل‌ه را به همراه غذا دریافت کردند (A-Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله شده توسط نانوذرات آلژینات-کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs-Al loaded Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله شده توسط نانوذرات کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs loaded Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله نشده به همراه نانوذرات آلژینات-کیتوزان را با غذا دریافت کردند (Cs-Al + Ghrelin 12). گروهی که نانوذرات آلژینات-کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs-Al). تمام داده‌ها به همراه انحراف معیار \pm بیان شده‌اند ($n = 9$).



شکل ۶- تغییرات بیان ژن GHS-R1a تحت تیمار غلظت‌های مختلف گرلین در بچه ماهی کپور معمولی. حروف متفاوت بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد. گروه شاهد (Control). گروهی که گرلین اصلی را به همراه غذا دریافت کردند (Ghrelin 12). گروهی

که گرلین استیله را به همراه غذا دریافت کردند (A-Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله شده توسط نانوذرات آلژینات-کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs-Al loaded Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله شده توسط نانوذرات کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs loaded Ghrelin 12). گروهی که گرلین اصلی نانوکپسوله نشده به همراه نانوذرات آلژینات-کیتوزان را با غذا دریافت کردند (Cs-Al + Ghrelin 12). گروهی که نانوذرات آلژینات-کیتوزان را به همراه غذا دریافت کردند (Cs-Al). تمام داده‌ها به همراه انحراف معیار \pm SD بیان شده‌اند ($n = 9$).

تغییرات بیان ژن GHS-R1a

میزان بیان ژن GHS-R1a در تیمارهایی که گرلین دریافت کرده بودند به صورت چشمگیری از گروه‌هایی که گرلین دریافت نکرده بودند بیشتر است ($p < 0/05$). بیشترین میزان بیان ژن GHS-R1a در تیمارهای Ghrelin 12 loaded Cs-Al و Ghrelin 12 مشاهده شد و کمترین میزان آن در گروه کنترل مشاهده شد.

بحث

صنعت آبی‌پروری به عنوان یکی از ارکان اصلی تأمین پروتئین حیوانی در جهان، همواره در پی راهکارهای نوین برای افزایش کارایی رشد و بهینه‌سازی هزینه‌های تولید بوده است. در این میان، استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال محرک هورمون رشد (GHRPs) به دلیل توانایی تحریک مستقیم محور رشد و اشتها، مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند (۲، ۳). با این حال، چالش اصلی در کاربرد عملی این ترکیبات، ناپایداری ذاتی آن‌ها در دستگاه گوارش و جذب محدود است که موجب کاهش قابل ملاحظه کارایی زیستی می‌شود (۱۱، ۱۳). مطالعه حاضر با هدف غلبه بر این چالش و با رویکردی ترکیبی طراحی شد: از یک سو به ارزیابی اثرات دو پپتید Ghrelin 12 و آنالوگ اصلاح‌شده استیله آن A-Ghrelin 12 بر بیان ژن‌های کلیدی محور رشد و شاخص‌های رشد در ماهی کپور معمولی پرداخته و از سوی دیگر، نقش فناوری نانوکپسوله‌سازی با نانوذرات هیبریدی کیتوزان-آلژینات را در افزایش اثربخشی این پپتیدها بررسی نموده است.

یافته‌های این پژوهش به‌وضوح نشان می‌دهد که هر دو فرم آزاد و نانوکپسوله‌شده پپتیدها، به‌طور معنی‌داری بیان ژن‌های NPY، IGF1 و GHS-R1a را نسبت به گروه شاهد افزایش داده و منجر به بهبود برجسته پارامترهای رشد نظیر وزن نهایی و میانگین رشد چهارهفته‌ای شدند. این نتایج به‌طور کلی با یافته‌های مطالعات پیشین در گونه‌های آبی مختلف که نشان داده‌اند پپتیدهای شبه گرلین قادر به تحریک محور GH/IGF1 و بهبود رشد هستند، همسو می‌باشد (۱، ۴). با این حال، نوآوری و نکته تمایز اصلی این مطالعه، نه در تأیید این اثر کلی، بلکه در ارائه شواهد قانع‌کننده‌ای است که نشان می‌دهد نانوکپسوله‌سازی و اصلاح ساختاری پپتید می‌تواند به شکل چشمگیری این اثرات را تقویت کند.

افزایش معنی‌دار بیان ژن IGF1 در کبد ماهیان تیمار شده را می‌توان نقطه اتصال اصلی اثرات رشدزایی پپتیدهای مورد مطالعه دانست. IGF1 به عنوان میانجی اصلی اثرات آنابولیک هورمون رشد (GH) شناخته می‌شود که مستقیماً سنتز پروتئین، تکثیر و تمایز سلولی را در بافت‌های هدف تحریک می‌کند (۸). به نظر می‌رسد پپتیدهای Ghrelin 12 و A-Ghrelin 12 از طریق اتصال به گیرنده‌های خود در هیپوتالاموس و هیپوفیز (۸، ۹)، ترشح GH را تحریک کرده و در نتیجه فعال‌سازی آبخاری سیگنالینگ محور GH/IGF1 را به همراه داشته‌اند. قابل ذکر است که در این مطالعه، گروه‌های دریافت‌کننده فرم‌های نانوکپسوله‌شده، به‌ویژه گروه Cs-Al -A-Ghrelin 12، بالاترین سطح بیان IGF1 را نشان دادند. این موضوع به‌وضوح حاکی از آن است که نانوکپسوله‌سازی با بهبود پایداری و افزایش جذب پپتید، منجر به تحریک قوی‌تر و احتمالاً پایدارتر این محور شده است. این نتیجه کاملاً با تئوری عملکرد نانوحامل‌های پلیمری که بر محافظت از بار فعال در برابر محیط نامساعد دستگاه گوارش و افزایش نفوذپذیری آن تأکید دارند، مطابقت دارد (۱۱، ۱۷).

افزایش بیان ژن NPY در بافت مغز نیز از یافته‌های بسیار مهم این پژوهش است. نوروپپتید Y (NPY) یکی از قوی‌ترین اورژیک‌های شناخته‌شده در مهره‌داران است که عمدتاً در نورون‌های هیپوتالاموسی بیان شده و با تحریک مراکز اشتها، مصرف غذا را به شدت افزایش می‌دهد (۷، ۱۸). افزایش معنی‌دار بیان این ژن در تمام گروه‌های تیمار شده با پپتیدها، به‌ویژه در گروه A-Ghrelin 12، نشان می‌دهد که این پپتیدها علاوه بر تحریک مستقیم محور رشد، از طریق یک مکانیسم غیرمستقیم نیز می‌توانند به بهبود رشد کمک کنند؛ به عبارت دیگر، تحریک ترشح NPY می‌تواند منجر به افزایش اشتها و در نتیجه مصرف غذای بیشتر در ماهیان شود. افزایش دریافت مواد مغذی، سوخت و ساز لازم برای فرآیندهای آنابولیک تحریک‌شده توسط IGF1 را فراهم می‌کند و در نهایت به افزایش وزن و رشد بهتر می‌انجامد. این یافته، جنبه دیگری از عملکرد چندوجهی پپتیدهای شبه‌گرلین را در تنظیم یکپارچه فیزیولوژی رشد و متابولیسم آشکار می‌سازد.

در مورد ژن GHS-R1a که کدکننده یکی از گیرنده‌های اصلی گرلین است، افزایش بیان آن در پاسخ به تیمار با پپتیدها قابل انتظار بود (۶). این افزایش ممکن است نشان‌دهنده یک مکانیسم تطابقی یا فیدبک مثبت در سطح گیرنده باشد. قرار گرفتن مداوم در معرض لیگاند (پپتیدهای گرلین) می‌تواند با بالا بردن تراکم گیرنده در غشای سلول‌های هدف (up-regulation)، حساسیت سیستم را افزایش داده و سیگنال‌دهی ناشی از پپتیدها را تقویت کند. جالب توجه است که در این مطالعه، گروه‌های دریافت‌کننده فرم آزاد Ghrelin 12 و فرم نانوکپسوله‌شده Ghrelin 12 بیشترین افزایش را در بیان این ژن نشان دادند. این الگو ممکن است بازتابی از تفاوت در فارماکوکینتیک (سرعت و مدت آزادسازی) پپتید در فرم‌های مختلف باشد.

مقایسه دقیق بین هفت گروه تیماری، اطلاعات ارزشمندی در مورد اهمیت فرمولاسیون ارائه می‌دهد. اولاً، برتری واضح گروه‌های دریافت‌کننده پپتید (هم آزاد و هم کپسوله) نسبت به گروه‌های کنترل و نانوذرات خالی (Cs-AI)، مؤید اثر اختصاصی خود پپتیدهاست. ثانیاً و از همه مهم‌تر، عملکرد برتر گروه‌های نانوکپسوله‌شده نسبت به گروه‌های آزاد و حتی برتر از گروه مخلوط غیرکپسوله (Cs-AI + Ghrelin 12)، شاهدهی قوی بر ضرورت محصورسازی فیزیکی پپتید در ماتریکس نانوذره است. این برتری احتمالاً از چند طریق توجیه می‌شود. ۱: محافظت فیزیکی در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک و محیط اسیدی معده که عمر پپتید آزاد را به شدت کاهش می‌دهد (۱۴). ۲: افزایش زمان ماندگاری و تماس با مخاط روده به دلیل خواص چسبندگی کیتوزان که فرصت جذب را افزایش می‌دهد (۱۱). ۳: امکان رهایش کنترل‌شده و تدریجی پپتید در طول روده که از ایجاد غلظت‌های ناگهانی و احتمالاً سمی جلوگیری کرده و یک تحریک پایدارتر ایجاد می‌کند (۱۷). عملکرد ضعیف‌تر گروه «مخلوط» نسبت به گروه‌های کپسوله، نشان می‌دهد که صرف وجود هم‌زمان نانوذرات و پپتید در غذا کافی نیست و تعامل فیزیکی نزدیک و محصورسازی، شرط لازم برای دستیابی به اثر حداکثری است.

طراحی و استفاده از آنالوگ استیل‌شده A-Ghrelin 12 یکی دیگر از جنبه‌های نوآورانه این پژوهش بود. استیل‌شدن در انتهای N یا C پپتیدهای گرلین، یک اصلاح رایج برای افزایش پایداری در برابر آنزیم‌ها و نیز افزایش میل اتصال به گیرنده GHS-R1a است (۵، ۱۳). نتایج این مطالعه نشان داد که A-Ghrelin 12 در فرم آزاد، عملکردی معادل یا در برخی موارد مانند تحریک بیان NPY حتی بهتر از Ghrelin 12 طبیعی دارد. این موضوع اهمیت مهندسی پپتید را به عنوان یک راهکار مکمل برای نانوکپسوله‌سازی نشان می‌دهد. زمانی که این آنالوگ اصلاح‌شده در سیستم نانوکپسوله‌سازی کارآمد کیتوزان-آلژینات قرار گرفت (A-Ghrelin 12) (Cs-AI)، بهترین نتایج در اغلب پارامترهای رشد و مولکولی حاصل شد. این یافته به‌وضوح پیشنهاد می‌کند که ترکیب دو استراتژی (اصلاح ساختار پپتید و استفاده از سیستم رهایش پیشرفته) می‌تواند اثر سینرژیک داشته و حداکثر پتانسیل رشدزایی را محقق کند.

مطالعات داخلی منتشر شده نیز بر اهمیت بهینه‌سازی شرایط پرورش و استفاده از محرک‌های رشد در آبزیان تأکید دارند. برای مثال، یک مطالعه نشان داد که افزودن سرکه سیب به جیره ماهی قزل‌آلا می‌تواند عملکرد رشد را بهبود بخشد (۱۹). همچنین، مطالعه‌ای دیگر گزارش کرد که افزایش کنترل‌شده دمای آب، رشد و فرآیندهای تکوینی را در لارو تاسماهی تسریع می‌کند (۲۰). مطالعه حاضر با ترکیب دو راهبرد مؤثر فوق یعنی استفاده از یک پپتید محرک رشد (گرلین) و به‌کارگیری فناوری نانوکپسوله‌سازی برای افزایش پایداری و کارایی آن گامی فراتر نهاده و نشان می‌دهد که رویکردهای تلفیقی می‌توانند دستاوردهای چشمگیری در بهبود کمی و کیفی تولید آبزیان داشته باشند.

با وجود نتایج امیدوارکننده، این مطالعه در چارچوب شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی انجام شده و برای تعمیم به سطح صنعت، ملاحظات و تحقیقات بیشتری لازم است. نخست، ارزیابی اقتصادی دقیق فرآیند سنتز پپتید، تولید نانوذرات و اختلاط با غذا در مقیاس بزرگ ضروری است. دوم، انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای در شرایط واقعی پرورش (با تنش‌های محیطی، تراکم‌های مختلف و رژیم‌های غذایی متنوع) برای تأیید کارایی عملی و پایداری نتایج الزامی می‌باشد. سوم، بررسی اثرات بلندمدت (در کل دوره پرورش تا بازار) بر سلامت ماهی، کیفیت لاشه، پارامترهای ایمنی و فیزیولوژی تولیدمثل، از ملزومات ایمنی‌سنجی این فناوری است. چهارم، تحقیق بر روی گونه‌های اقتصادی مهم دیگر (مانند قزل‌آلا، تیلاپیا) برای بررسی امکان تعمیم‌پذیری این روش مفید خواهد بود.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، این مطالعه به‌طور قانع‌کننده‌ای نشان می‌دهد که استفاده از پپتیدهای محرک رشد مانند Ghrelin 12 و به‌ویژه آنالوگ اصلاح‌شده A-Ghrelin 12، زمانی که با فناوری نانوکپسوله‌سازی مبتنی بر حامل‌های زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر مانند نانوذرات کیتوزان-آلژینات ترکیب شوند، می‌توانند استراتژی مؤثری برای بهبود کمی و کیفی تولید در صنعت آبزی‌پروری باشند. این رویکرد ترکیبی نه تنها محدودیت‌های عمده کاربردی پپتیدها را رفع می‌کند، بلکه با تحریک هم‌زمان مسیرهای مستقیم (GH/IGF1) و غیرمستقیم (NPY/اشتها) رشد، بهینه‌سازی جامعی را ارائه می‌دهد. یافته‌های حاضر پایه‌ای مستحکم برای تحقیقات آتی در جهت بهینه‌سازی فرمولاسیون (مانند نسبت کیتوزان به آلژینات، اندازه ذرات)، کاهش هزینه‌ها و توسعه پروتکل‌های کاربردی برای گونه‌های مختلف فراهم می‌سازد. پذیرش چنین فناوری‌های پیشرفته‌ای می‌تواند سهم مهمی در افزایش بهره‌وری، پایداری و رقابت‌پذیری صنعت آبزی‌پروری در سطح جهانی ایفا نماید.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منفعی ندارند.

سپاسگزاری

تأمین‌کننده مالی برای این مقاله وجود ندارد.

منابع

1. Rodríguez-Viera L, Martí I, Martínez R, Perera E, Estrada MP, Mancera JM, et al. Feed Supplementation with the GHRP-6 Peptide, a Ghrelin Analog, Improves Feed Intake, Growth Performance and Aerobic Metabolism in the Gilthead Sea Bream *Sparus aurata*. *Fishes*. 2022;7(1):31. <https://doi.org/10.3390/fishes7010031>

۲. Martínez R, Carpio Y, Arenal A, Lugo JM, Morales R, Martín L, et al. Significant improvement of shrimp growth performance by growth hormone-releasing peptide-6 immersion treatments. *Aquacult Res.* 2017;48(9):4632-45. <https://doi.org/10.1111/are.13286>
۳. Canosa LF, Bertucci JI. The effect of environmental stressors on growth in fish and its endocrine control. *Frontiers in endocrinology.* 2023;14:1109461. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1109461>
۴. Xue L, Gao Y, Zhang S, Weng M, Zeng G, Chen J, et al. Expression pattern of the fused in sarcoma gene and its contextual influence on the density-specific response of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis in zig-zag eels (*Mastacembelus armatus*). *Frontiers in Marine Science.* 2024;11:1461451. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1461451>
۵. Zhong H, Hu Y, Yu F. A review on ghrelin and fish reproduction. *Reproduction and Breeding.* 2021;1(2):128-35. <https://doi.org/10.1016/j.repbre.2021.07.004>
۶. Yu P, Zhou Y, Qi X, Fan H, Zhang K, Zhang X, et al. Identification, expression analysis, and functional characterization of ghrelin and its receptors in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *Marine Life Science & Technology.* 2020;2(4):349-59. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.02.013>
۷. Yuan D, Gao Y, Zhang X, Wang B, Chen H, Wu Y, et al. NPY and NPY receptors in the central control of feeding and interactions with CART and MC4R in Siberian sturgeon. *Gen Comp Endocrinol.* 2019;284:113239. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113239>
۸. Kuznetsova M, Rodin M, Shulgina N, Krupnova MY, Kuritsyn A, Nemova N. Gene Expression of GH/IGF axis components and myogenic regulatory factors in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walb) under the Influence of continuous lighting. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2025;61(1):162-76. <https://doi.org/10.1134/S0022093025010132>
۹. Yahashi S, Kang KS, Kaiya H, Matsuda K. GHRP-6 mimics ghrelin-induced stimulation of food intake and suppression of locomotor activity in goldfish. *Peptides.* 2012;34(2):324-8. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.025>
۱۰. Valipour A, Heidari B, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H, Ghorbani M, Shahriari A, Iman M, et al. Enhancement of zebrafish (*Danio rerio*) immune and antioxidant systems using medicinal plant extracts encapsulated in alginate-chitosan nanocapsules with slow sustained release. *Biologia Futura.* 2024;1-15. <https://doi.org/10.1007/s42977-024-00244-0>
۱۱. Zainuddin SZ, Hamid KA. Chitosan-based oral drug delivery system for peptide, protein and vaccine delivery. *Chitin and Chitosan-physicochemical properties and industrial applications.* 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95771>
۱۲. Meng-Han C. Fish oral vaccine and mucosal immunity. *Aquacult Int.* 2024;32(2):1335-48. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01219-z>
۱۳. Matinfar M, Heidari B, Valipour A, Rahdari T, Ramezanzpour S, Hadavi M, et al. Superior growth performance in carp fry achieved with chitosan-alginate encapsulated A-ghrelin versus free peptide: Evidence from physiological, molecular, and morphological analyses. *PloS one.* 2025;20(6):e0327235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327235>

۱۴. Valipour A, Heidari B, Asghari SM, Balalaie S, Rabouti H, Omidian N. The effect of different exogenous kisspeptins on sex hormones and reproductive indices of the goldfish (*Carassius auratus*) broodstock. *J Fish Biol.* 2021;98(4):1137-43. <https://doi.org/10.1111/jfb.14645>
۱۵. Sedigh E, Heidari B, Roozati A, Valipour A. The effect of different intensities of static magnetic field on stress and selected reproductive indices of the zebrafish (*Danio rerio*) during acute and subacute exposure. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2019;102(2):204-9. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-02538-1>
۱۶. Rabouti H, Asghari SM, Sariri R, Balalaie S, Valipour A, Omidian N, et al. Functional evaluation of a novel kisspeptin analogue on the reproduction of female goldfish. *Scientific Reports.* 2022;12(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25950-4>
۱۷. Berlanga-Acosta J, Abreu-Cruz A, Barco Herrera DG-d, Mendoza-Marí Y, Rodríguez-Ulloa A, García-Ojalvo A, et al. Synthetic Growth Hormone-Releasing Peptides (GHRPs): a historical appraisal of the evidences supporting their cytoprotective effects. *Clinical Medicine Insights: Cardiology.* 2017;11:1179546817694558. <https://doi.org/10.1177/1179546817694558>
۱۸. Robinson SL, Thiele TE. The role of neuropeptide Y (NPY) in alcohol and drug abuse disorders. *Int Rev Neurobiol.* 2017;136:177-97. <https://doi.org/10.1016/bs.irm.2017.06.005>
۱۹. اسدس، س.، احمدنای مطلق، ح.، صفری، ا.، وردست زاده، ح.، زراعت پیشه، ی.، جوادمنش، ع. اثر سطوح مختلف سرکه سیب موجود در جیره غذایی، بر عملکرد رشد و بیان برخی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مبتلا به کبد چرب غیرالکلی. *مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)*. ۱۴۰۳. جلد ۳۷، شماره ۴، صفحات ۲۹۴ تا ۳۱۰. <https://doi.org/10.22034/jar.2023.2344>
۲۰. جعفری، ن.، فلاحتکار، ب.، مارتینز، ر.، کاناریو، آ. اثر دما بر عملکرد رشد و تکامل اسکلتی لارو تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*). *مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)*. ۱۴۰۳. جلد ۳۷، شماره ۴، صفحات ۳۲۷ تا ۳۴۳. <https://doi.org/10.22034/jar.2024.2352>

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه Real-Time PCR

ژن	(۵'-۳') توالی پرایمر رو به جلو	(۵'-۳') پرایمر رو به عقب	طول محصول (bp)
IGF1	TTCCATCAAAGACCCACGAG	TTCCACAGAGGCTTGTCCTCA	152
NPY	GACTTCGAGCAGGAGATGGG	CCGCAAGATTCCATACCCAGG	185
GHS-R1a	ATGCTGCTGGTGCTGTTCTT	TCAGGGTCAGGTTGTTGTGG	198
β -actin	CGTGACATCAAGGAGAAGCT	TGCCAGATCTTCTCCATGTC	210

Abstract

Increasing growth efficiency in aquaculture through bioactive compounds such as growth hormone-releasing peptides (GHRPs) is a novel strategy in the fisheries industry. This study investigated the effects of two peptides, Ghrelin 12 and A-Ghrelin 12 (its acylated form), both in free and encapsulated forms within chitosan-alginate nanoparticles, on the expression of growth-related genes (IGF1, NPY, and GHS-R1a) in common carp fingerlings. First, the optimal peptide dose (100 µg per kg of feed) was determined in a preliminary trial. The fish were then divided into seven groups: control, free Ghrelin 12, free A-Ghrelin 12, chitosan-alginate encapsulated Ghrelin 12, chitosan encapsulated Ghrelin 12, a mixture of Ghrelin 12 and nanoparticles (non-encapsulated), and an empty nanoparticle group. After four weeks of feeding, samples were taken from the brain and liver tissues, and gene expression was assessed using Real-Time PCR. The results showed that Ghrelin 12 and A-Ghrelin 12 peptides, especially in their encapsulated forms, significantly increased the expression of IGF1, NPY, and GHS-R1a genes and led to improved weight gain and growth in the fish. The greatest effect was observed in the group treated with chitosan-alginate encapsulated A-Ghrelin 12, indicating the effective role of the nanocarrier in enhancing peptide stability and absorption. Furthermore, A-Ghrelin 12 demonstrated similar or superior performance to Ghrelin 12 in growth stimulation. This study confirms the efficacy of using growth-stimulating peptides combined with nano-encapsulation technology in aquaculture and paves the way for future research on optimizing bioactive formulations.

Keywords: Growth-stimulating peptides, Nanoencapsulation, Gene expression, Common carp, Growth hormone