

اثر دما، مراحل رسیدگی جنسی و مهاجرت بر سیستم ایمنی غیراختصاصی سرم و مخاط جنس نر ماهی سفید دریای خزر با تاکید بر لیزوزیم

فریبا فرزادفر^۱، بهروز حیدری^{۲*}، محمودرضا آقامعالی^۳

۱- کارشناس ارشد زیست دریا، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

چکیده

سیستم ایمنی غیر اختصاصی همورال به عنوان اولین خط دفاعی نقش مهمی را در حمایت جانور علیه بیماری‌ها ایفا می‌کند. مطالعه حاضر به منظور اثرات مراحل مختلف رشد بیضه، دما و رفتار مهاجرت بر میزان لیزوزیم و پروتئین تام سرم خون و مخاط پوست جنس نر ماهی سفید دریای خزر انجام پذیرفت. نمونه‌برداری ماهانه (مهر تا اردیبهشت ۱۳۹۱) از منطقه جفود انزلی صورت پذیرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، سرم خون و مخاط پوست از آن‌ها تهیه شد. میزان لیزوزیم و پروتئین تام به ترتیب با استفاده از روش توربیدیمتری و روش برادفورد اندازه‌گیری شد. پس از تشخیص مراحل مختلف رسیدگی جنسی بر اساس مشاهدات بافت‌شناسی، نتایج نشان داد لیزوزیم سرم خون ماهی طی ماه‌های نمونه‌برداری از مهر تا دی روند صعودی داشت و سپس بعد از آن تا اسفند نزول پیدا کرد و نهایتاً تا اردیبهشت افزایش یافت. میزان لیزوزیم مخاط پوست تا ماه آذر روند صعودی معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) و سپس تا ماه اسفند طی کاهش دمای آب روند نزولی را طی کرد و در اوایل اردیبهشت با مهاجرت ماهی به رودخانه میزان آن به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). غلظت لیزوزیم سرم خون ماهی سفید خزر از مرحله رشد اولیه تا رشد ثانویه سلول‌های بیضه روند صعودی داشته و سپس بعد از آن در مرحله Matured رسیدگی جنسی نزول یافته، در مرحله تخم‌ریزی مجدداً افزایش یافت. تغییرات غلظت لیزوزیم طی مراحل مختلف رسیدگی جنسی در مخاط، همانند تغییرات در سرم است با این تفاوت که این تغییرات در مخاط پوست با اختلاف معنی‌داری همراه بوده است. پروتئین تام مخاط پوست از مهر تا اسفند به طور معنی‌داری کم شد و در اردیبهشت بعد از مهاجرت ماهی به رودخانه به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). پروتئین تام مخاط از مرحله رشد اولیه بیضه تا مرحله Matured روند نزولی را نشان داد ($P < 0.05$) اما بعد از مهاجرت ماهی به رودخانه برای تخم‌ریزی به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($P < 0.05$). نتایج نشان دهنده اثر مستقیم دما و رسیدگی جنسی، با تاثیر بیش‌تر دما، بر میزان لیزوزیم سرم خون و مخاط پوست است. همچنین غلظت لیزوزیم مخاط پوست به طور چشم‌گیری از سرم خون بیش‌تر بوده است.

واژگان کلیدی: ماهی سفید دریای خزر، لیزوزیم، توربیدیمتری.

مقدمه

تقاضای روز افزون بشر برای مصرف محصولات ماهی از طرفی و کاهش ذخایر وحشی این جانور از طرف دیگر، موجب تلاش‌های زیادی برای توسعه صنعت آبی‌پروری در دنیا شده است که متأسفانه هم‌زمان با رشد این صنعت، مشکل بیماری‌های خسارت‌زا به عنوان یکی از موانع رشد، بروز کرده است. بسیاری از این بیماری‌ها به دنبال استرس‌های ناشی از پرورش اتفاق می‌افتد به این دلیل مدیریت بیماری‌ها در صنعت آبی‌پروری از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (Soltani and Pourgholam, 2007). ساز و کارهای ایمنی غیر اختصاصی نقش مهمی در مراحل رفع یک عفونت دارند و از رشد و تکثیر عوامل عفونی بیماری‌زای باکتریایی، قارچی، انگلی و ویروسی جلوگیری می‌کند. ایمنی در ماهیان همانند همه مهره‌داران دیگر نقش مهمی را در حمایت جانور علیه بیماری‌ها داشته است که به دو دسته ایمنی غیر اختصاصی (ذاتی) و ایمنی اختصاصی تقسیم می‌شود (Kumari و همکاران، ۲۰۰۶). سیستم ایمنی غیر اختصاصی یا ذاتی سریع‌تر از سیستم ایمنی اختصاصی در پاسخ به عفونت‌ها عمل می‌کند (Saurabh و همکاران، ۲۰۰۸). ایمنی غیر اختصاصی در ماهی و مهره‌داران عالی، شامل ایمنی غیر اختصاصی همورال (ترکیبات مایع) و ایمنی غیر اختصاصی سلولی است که این دو خود شامل اجزایی هستند (Ellis, ۱۹۹۰). ایمنی غیر اختصاصی همورال به عنوان اولین خط دفاعی است در حالی که ایمنی غیر اختصاصی سلولی به عنوان دومین خط دفاعی در برابر تهاجم میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کند (Soltani and Pourgholam, 2007). لیزوزیم به عنوان مهم‌ترین پارامتر سیستم ایمنی غیر اختصاصی همورال، یک پلی‌پپتید با وزن مولکولی بین ۱۴ تا ۱۸ کیلودالتون است که در طیف وسیعی از مهره‌داران از جمله گونه‌های آب شیرین و دریایی وجود دارند و از آن به عنوان داروی ضد باکتریایی نام می‌برند (Itami و همکاران، ۱۹۹۲؛ Yousif و همکاران، ۱۹۹۱). این آنزیم از گرانول‌های گلبول‌های سفید (بیش‌تر توسط نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و کم‌تر توسط ماکروفاژها) و همچنین بافت‌های غنی از لکوسیت‌ها از جمله کلیه، مخاط پوست، طحال، آبشش و دستگاه گوارش ترشح می‌شود، چون این محل‌ها در ماهیان بیش‌تر از سایر مناطق مورد تهاجم باکتری‌ها قرار می‌گیرد (Holloway و همکاران،

۱۹۹۳). این آنزیم قادر به شکستن پیوند گلیکوزیدی لایه پپتیدوگلیکان (از زنجیره بتای ۱-۴ N استیل مورامیک اسید و N استیل گلوکزآمین) در دیواره سلولی باکتری‌ها است. لیزوزیم علیه باکتری گرم مثبت به طور مستقیم و بر باکتری گرم منفی بعد از عمل عامل مکمل عمل می‌کند (Yano, ۱۹۹۶).

عوامل متعددی بر میزان و نیز قدرت ضد باکتریایی لیزوزیم تاثیر می‌گذارد، از جمله رسیدگی جنسی، فصل، سن، دمای محیط و همچنین مصرف مواد محرک (Soltani and Pourgholam, 2007). بنابراین با توجه به خاصیت ضد میکروبی این آنزیم و حضور آن در این گونه بافت‌ها، می‌توان گفت لیزوزیم نقش مهمی برای مواجهه با عوامل بیماری‌زای عفونی را برای ماهیان ایفا می‌کند.

ماهی سفید از ماهیان استخوانی متعلق به خانواده Cyprinidae، جنس *Rutilus* با نام علمی *Rutilus frisii kutum* از ماهیان بومی دریای خزر است (تکه و همکاران، ۱۳۸۷) که از قدیم الایام به دلیل گوشت لذیذ و ارزش اقتصادی بالا، جایگاه خاصی در میان مناطق شمالی کشور داشته است. این ماهی از نظر رژیم غذایی در گروه ماهیان همه چیز خوار قرار دارد، ماهیان کوچک‌تر از دیاتومه‌ها و سخت‌پوستان و ماهیان بزرگ‌تر از لارو و شفیره حشرات و بی‌مهرگان تغذیه می‌کنند (Safari et al., 2009).

با توجه به اهمیت سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان و نیز با توجه به این که سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهی به دلیل تخصص کم‌تر ایمنی اختصاصی، اهمیت بیش‌تری نسبت به مهره‌داران عالی دارد و به عنوان اولین خط دفاعی در ماهیان عمل می‌کند و به دلیل از بین رفتن بسیاری از مسیرهای مهاجرت طبیعی ماهی سفید (به دلیل دخالت انسان)، این زیر گونه تنها از طریق طبیعی نمی‌تواند بازسازی شود، لذا به تکثیر مصنوعی آن نیازمندیم و از آن جایی که علت اصلی مرگ و میر ماهی سفید چه در دریا و چه در مراکز پرورش، بیماری‌های میکروبی و ویروسی است، شناخت دستگاه ایمنی غیر اختصاصی و واکنش‌های دفاعی آن به عوامل بیماری‌زا، لازمه کنترل بیماری‌ها در این ماهی است. از طرفی، تاکنون مطالعه‌ای روی سیستم غیر اختصاصی این ماهی صورت نگرفته است در این مطالعه سعی شده است تاثیر رسیدگی جنسی و دما بر سطح لیزوزیم (مهم‌ترین پارامتر سیستم ایمنی

غیر اختصاصی همورال) سرم و بافت مخاط پوست و همچنین پروتئین تام مخاط پوست جنس نر ماهی سفید بررسی شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از ماهی سفید جنس نر دریای خزر به صورت ماهانه از مهر تا اردیبهشت سال ۱۳۹۱ از منطقه جفرود بندر انزلی (E ۳۳° ۴۹'، N ۲۷° ۳۷') در دو بخش دریایی و رودخانه‌ای هم‌زمان با ثبت دمای آب هنگام نمونه‌برداری انجام گرفت. نمونه‌ها برای تهیه سرم خون و مخاط سطح بدن به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از خون‌گیری از نمونه‌ها (از قسمت انتهایی باله مخرجی)، با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه)، سرم خون تهیه شد. مخاط سطح پوست نیز بلافاصله بعد از بیرون آوردن ماهی‌ها از آب، توسط یک عدد لام که در جهت خواب فلس‌ها روی سطح بدن ماهی، به جز مخرج، کشیده شد به دست آمد. سرم خون و مخاط تهیه شده برای انجام بقیه مراحل آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش لیزوزیم

سطح لیزوزیم سرم خون و مخاط پوست با استفاده از روش Turbidimetric بر اساس روش Ellis (1990) تعیین شد. در این روش از باکتری *Micrococcus lysodeikticus* لیوفلاز شده استفاده شد. برای انجام هر تست ۳۸۰ میکرولیتر از محلول باکتری *M. lysodeikticus* (۰/۱ میلی‌گرم از باکتری با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار pH: ۶/۲ مخلوط شد) با ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه مخلوط شد و سپس کاهش کدورت آن طی ۱۸۰ ثانیه در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Ultraspect 3000, Pharmacia Biotech) خوانده شد. با کمک این روش فعالیت لیزوزیم سنجیده شد و سپس به منظور تعیین مقدار غلظت لیزوزیم موجود در سرم خون و مخاط

پوست، از منحنی استاندارد لیزوزیم تجاری (Merck, Germany) به دست آمده از سفیده تخم مرغ در رقت‌های مختلف، استفاده شد.

سنجش پروتئین تام

تعیین میزان پروتئین تام سرم خون و مخاط پوست با استفاده از روش برادفورد (Bradford, 1976) انجام پذیرفت. در این روش ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد (کوماسی بریلینت Blue G-250، اورتوفسفریک اسید و اتانول) با ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه مخلوط شد و میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. سپس به منظور تعیین مقدار غلظت پروتئین تام نمونه‌ها، منحنی استاندارد برادفورد که از سرم آلبومین گاوی (BSA) رقت‌های مختلفی برای ترسیم آن تهیه شد، مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین مراحل رسیدگی جنسی

برای تعیین مراحل مختلف رسیدگی جنسی، اندام جنسی نر از نمونه جدا شده و پس از تثبیت نمونه‌های بافتی در محلول بوئن و انجام مراحل آماده‌سازی (آب‌گیری، شفاف‌سازی، قالب‌گیری، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی) مقاطع بافتی به دست آمده با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز داده‌ها

از آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون دانکن با درجه اطمینان ۹۵٪ و همچنین همبستگی پیرسون، به منظور بررسی داده‌های میزان لیزوزیم در مراحل مختلف رشد بیضه و در ماه‌های مختلف توسط نرم افزار SPSS ورژن ۱۷ در محیط ویندوز ۷ استفاده شد. پراکنش نرمال داده‌ها نیز با استفاده از تست کولموگروف-اسمیروف آنالیز شد.

نتایج

داده‌های نتایج، ناشی از اثرات دما و رسیدگی جنسی بر میزان لیزوزیم در جنس نر ماهی سفید دریای خزر است که در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: میانگین لیزوزیم اندازه‌گیری شده به صورت ماهانه و در طی مراحل مختلف رسیدگی جنسی در سرم خون و مخاط پوست جنس نر ماهی سفید خزر

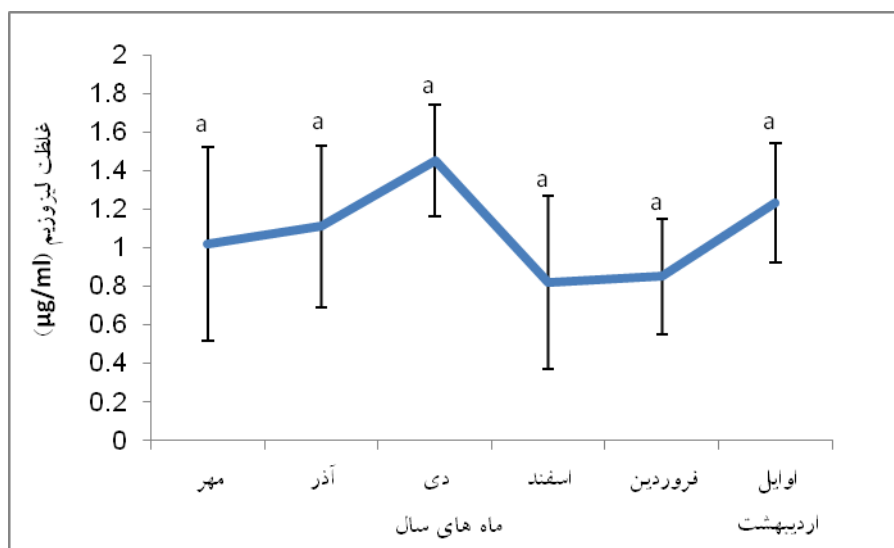
ماه‌های سال	میانگین لیزوزیم سرم ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	میانگین لیزوزیم مخاط ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	دما ی آب °C	میانگین لیزوزیم سرم ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	میانگین لیزوزیم مخاط ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	رسیدگی جنسی
مهر	$1/0.2 \pm 0/52$	$1/21 \pm 0/61$	۲۲/۵۳	$1/21 \pm 0/61$	$1/0.2 \pm 0/52$	Early maturing رشد اولیه
آذر	$1/11 \pm 0/42$	$20/0.3 \pm 3/28$	۱۱/۳۳	$8/14 \pm 2/66$	$1/45 \pm 0/29$	Late maturing رشد ثانویه
دی	$1/45 \pm 0/29$	$14/0.9 \pm 6/87$	۷/۷۷			
اسفند	$0/82 \pm 0/45$	$0/83 \pm 0/36$	۷/۲۶	$0/99 \pm 0/2$	$0/85 \pm 0/52$	Matured بالغ
فروردین	$0/85 \pm 0/30$	$0/9 \pm 0/41$	۱۲/۲			
اردیبهشت	$1/23 \pm 0/31$	$4/63 \pm 1/14$	۱۵/۱	$4/63 \pm 1/14$	$1/23 \pm 0/31$	Spawning تخم‌ریزی

میزان لیزوزیم سرم خون و مخاط پوست طی ماه‌های نمونه‌برداری

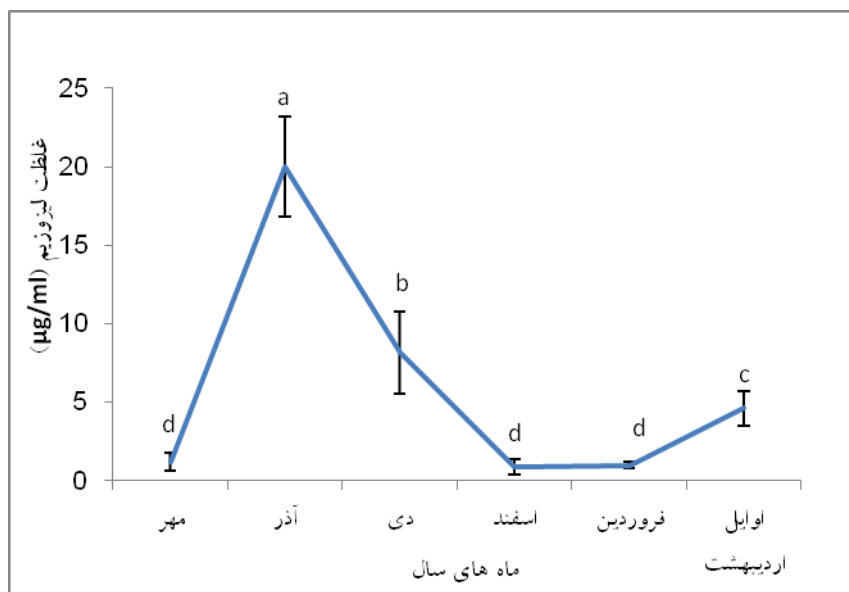
سرم خون: نتایج به دست آمده از مطالعه لیزوزیم موجود در سرم خون جنس نر ماهی سفید نشان داد که این ماده از ماه مهر تا دی روند صعودی داشت و در این ماه بیش‌ترین میزان لیزوزیم را به خود اختصاص داد (شکل ۱). ماه اسفند و اوایل فروردین که از سردترین ماه‌های سال بودند کم‌ترین میزان را نشان دادند. با بررسی‌های آماری انجام شده در این آزمایش تفاوت معنی‌داری بین بیش‌ترین میزان

لیزوزیم، در ماه دی و کمترین میزان آن در ماه اسفند مشاهده نشد ($P>0.05$). سپس در ماه اردیبهشت با مهاجرت ماهی به رودخانه میزان آن مجددا افزایش یافت.

مخاط پوست: نتایج به دست آمده از مطالعه لیزوزیم موجود در مخاط پوست جنس نر ماهی سفید تغییراتی را نشان داد (شکل ۲) به طوری که میزان آن از ماه مهر تا آذر روند صعودی را طی کرد به طوری که در آذر بیشترین میزان را به خود اختصاص داد و دارای تفاوت معنی‌داری با دیگر ماه‌ها بود ($P<0.05$). سپس تا ماه اسفند این روند نزولی بود. نهایتاً با گرم شدن هوا در اوایل اردیبهشت و مهاجرت ماهی به رودخانه میزان آن به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P<0.05$). ماه اسفند و اوایل فروردین ماه و همچنین ماه مهر کمترین میزان لیزوزیم را نشان دادند. میزان همبستگی مثبت بین روند نوسانات لیزوزیم سرم خون و مخاط پوست طی ماه‌های نمونه‌برداری دیده شد. ($r=0.42$)



شکل ۱: تغییرات لیزوزیم اندازه‌گیری شده سرم خون در طی ماه‌های مختلف سال



شکل ۲: تغییرات لیوزیم اندازه‌گیری شده مخاط پوست در طی ماه‌های مختلف سال

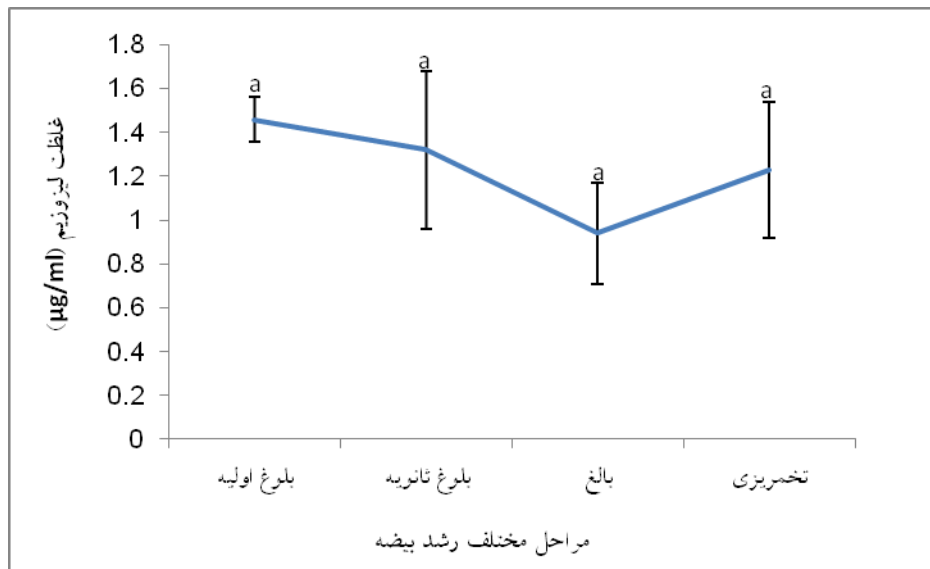
تغییرات لیوزیم سرم و مخاط پوست طی روند رشد بیضه

سرم خون: با توجه به بررسی‌های بافت‌شناسی و تقسیم‌بندی مراحل رشد بیضوی در ماهی سفید (بلوغ اولیه^۱، بلوغ ثانویه^۲، بالغ^۳ و تخم‌ریزی^۴)، سطح لیوزیم اندازه‌گیری شده با این که با تغییراتی همراه بوده است اما به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$; شکل ۳).

مخاط پوست: تغییرات غلظت لیوزیم طی مراحل مختلف رسیدگی جنسی در مخاط پوست (شکل ۴)، همانند تغییرات در سرم بوده است و همبستگی مثبت قوی ($r = 0.82$) بین این دو روند وجود

- 1- Early maturing
- 2- Late maturing
- 3- Matured
- 4- Spawning

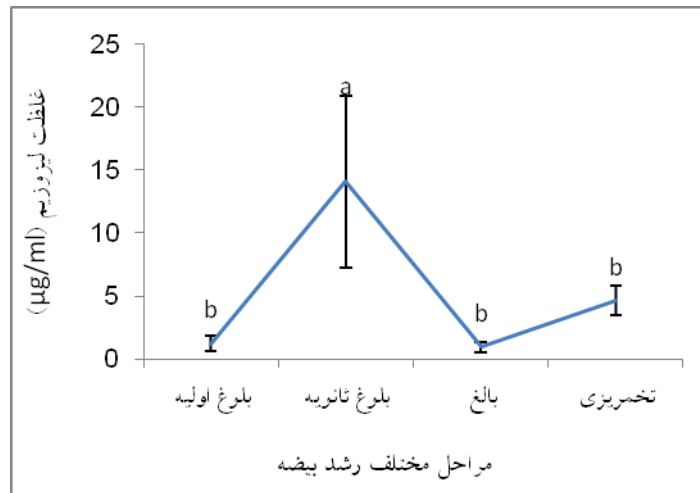
داشت. همچنین مرحله بلوغ ثانویه که بیشترین میزان لیزوزیم را نشان داد، دارای تفاوت معنی‌داری با دیگر مراحل بود ($P < 0.05$).



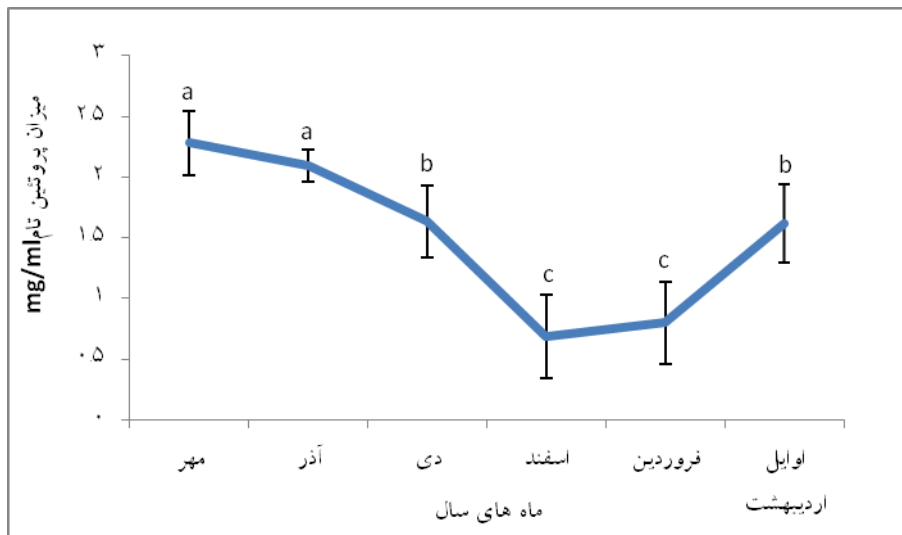
شکل ۳: تغییرات لیزوزیم اندازه‌گیری شده سرم خون طی مراحل مختلف رشد بیضه

میزان پروتئین تام مخاط پوست ماهی طی دوره نمونه‌برداری

مخاط پوست: شکل ۵ نشان می‌دهد میزان پروتئین تام مخاط پوست از ماه مهر تا ماه اسفند به طور معنی‌داری نزول یافت ($P < 0.05$) و در ماه اردیبهشت با مهاجرت ماهی به رودخانه به منظور تخم‌ریزی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$).



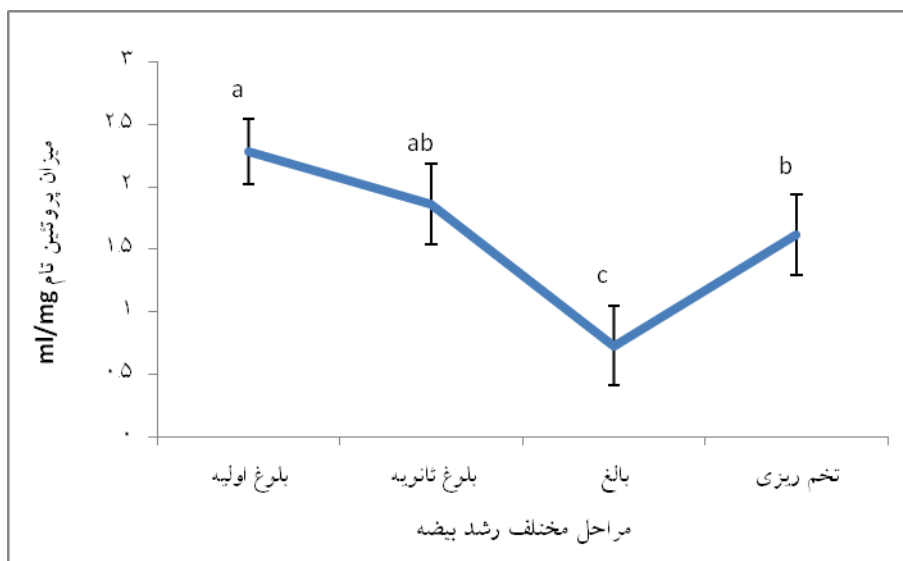
شکل ۴- میانگین لیزوزیم اندازه‌گیری شده مخاط پوست طی مراحل مختلف رشد میخه



شکل ۵: تغییرات پروتئین تام اندازه‌گیری شده مخاط پوست در طی ماه‌های مختلف سال

میزان پروتئین تام مخاط پوست ماهی طی دوره رشد بیضه

مخاط پوست: شکل ۶ نشان می‌دهد پروتئین تام مخاط از مرحله رشد اولیه بیضه تا مرحله بالغ روند نزولی داشت ($P < 0.05$)، اما بعد از مهاجرت ماهی به رودخانه برای تخم‌ریزی به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($P < 0.05$). نتایج نشان داد پروتئین تام در مرحله رشد اولیه بیضه بیش‌ترین و در مرحله بالغ کم‌ترین میزان را دارد.



شکل ۶- تغییرات پروتئین تام اندازه‌گیری شده مخاط پوست طی مراحل مختلف رشد بیضه

بحث

در این پژوهش سعی شده بود که به بررسی اثر دما و رسیدگی جنسی بر میزان لیزوزیم سرم خون و مخاط پوست و همچنین پروتئین تام مخاط پوست جنس نر ماهی سفید دریای خزر پرداخته شود. مواد ضد میکروبی از جمله لیزوزیم، در سرم و موکوس پوست، آبشش‌ها، بافت‌ها و روده ماهیان به عنوان اولین

خط دفاعی غیر اختصاصی عمل می‌کنند و مانع چسبیدن و تثبیت میکروارگانیسم‌ها بر روی سطوح پوشش خارجی (پوست و آبشش) و داخلی (مجرای گوارشی) می‌شوند. عوامل متعددی بر میزان لیزوزیم ماهی موثر است از جمله فصل، مرحله رسیدگی جنسی، جنس ماهی، دما محیط، گونه ماهی، استرس و مصرف مواد محرک ایمنی. اثر دمای آب بر نوسان فعالیت لیزوزیم پلاسما قبلاً در برخی از ماهیان استخوانی بررسی شده بود (Muona و Soivio، ۱۹۹۲؛ Hutchinson و Manning، ۱۹۹۶؛ Langston و همکاران، ۲۰۰۲). به طور کلی، همبستگی مثبت بین فعالیت لیزوزیم و دمای آب در بسیاری از گونه‌ها همچون ماهی آزاد دریایی، *Salmo trutta* (Muona و Soivio، ۱۹۹۲)، *Hippoglossus limandalimanda* (Hutchinson و Manning، ۱۹۹۶)، هالیبوت اطلس *Hippoglossus hippoglossus* (Langston و همکاران، ۲۰۰۲) گزارش شده است. تحت شرایط آزمایشگاهی، فعالیت لیزوزیم در پلاسمای تیلاپییای نیل، *Oreochromis niloticus* با افزایش دما از ۱۸/۴ تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته است (البته به جز ۳۳ درجه سانتی‌گراد؛ Dominguez و همکاران، ۲۰۰۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Swain و همکارانش به منظور بررسی میزان پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی در فصول مختلف سال بر کپور بزرگ هندی *Labeo rohita* صورت گرفت بیان کردند میزان سطح لیزوزیم و MPO (مایلوپراکسیداز) در این ماهی در فصل زمستان در مقایسه با دیگر فصل‌ها در پایین‌ترین حد خود قرار دارد. همچنین Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۴) با مطالعه روی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز خبر از کاهش سیستم ایمنی با کاهش دما دادند. در مطالعه‌ای که توسط Kumari و همکاران (۲۰۰۶) انجام گرفت و به بررسی پارامترهایی از ایمنی غیر اختصاصی از جمله لیزوزیم با تاثیر تغییرات فصلی بر روی این پارامترها در گربه ماهی آسیایی پرداخته شد، نشان داد میزان لیزوزیم در طول تابستان در مقایسه با دیگر فصل‌ها در پایین‌ترین سطح خود قرار دارد. در مطالعه حاضر نیز، نتایج نشان داد که غلظت لیزوزیم در فصل زمستان و ماه‌های سرد سال به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. پایین بودن سطح لیزوزیم چه در سرم و چه در مخاط پوست در فصل زمستان و آغاز فصل

سرما در حالی که ماهی در اواخر رسیدگی جنسی به سر می‌برد به نظر می‌رسد به دلیل کاهش میزان فعالیت بدن و همچنین کاهش عوامل پاتوژن و بیماری‌زا در محیط سرد آب باشد.

همچنین آغاز کاهش سطح لیزوزیم مخاط پوست در ماه دی نسبت به سرم که این کاهش در آن دیرتر آغاز می‌شود می‌تواند به دلیل تاثیر بیش‌تر و سریع‌تر کاهش دمای آب بر سطح بیرونی بدن ماهی (موکوس پوست) نسبت به بخش درونی ماهی باشد.

رسیدگی جنسی و مراحل رشد گناد از عوامل موثر بر میزان فعالیت سیستم ایمنی غیر اختصاصی است. در خصوص جنس نر مطالعه‌ای وجود نداشت اما در مورد جنس ماده مطالعاتی وجود دارد به طوری که Studnicka و همکاران (۱۹۸۶) نشان دادند سطح لیزوزیم در مرحله تخم‌ریزی در ماهی کپور افزایش می‌یابد. در مطالعه دیگری نیز نشان داده شده است که فعالیت لیزوزیم در پلاسمای تیلاپیا هم‌زمان با تکوین اووسیت افزایش یافته است (Takemura and Takano, 1995). در مطالعه حاضر، میزان سطح لیزوزیم در سرم و مخاط پوست ماهی سفید خزر در مراحل اواخر رشد بیضه کاهش می‌یابد که شاید به دلیل مصادف شدن با فصل سرد زمستان و غلبه کاهش دما بر رسیدگی جنسی باشد.

میزان تغییرات لیزوزیم در پوست و خون ماهیان متفاوت است. Lie و همکارانش (۱۹۸۹) نشان دادند که غلظت لیزوزیم در مخاط پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان از سرم خون بیش‌تر است. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که غلظت لیزوزیم مخاط پوست بیش‌تر از میزان آن در سرم ماهی سفید است. به نظر می‌رسد به دلیل این که مخاط پوست بدن به عنوان بیرونی‌ترین بخش محافظ ماهی است و اولین خط دفاعی در برابر هجوم انواع باکتری‌ها محسوب می‌شود، فعالیت بیش‌تری را نسبت به لیزوزیم سرم خون به خود اختصاص داده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد مهاجرت و تغییر محل زندگی بر میزان فعالیت سیستم ایمنی غیر اختصاصی تاثیرگذار است. مطالعه‌ای که توسط Fast و همکارانش (۲۰۰۲) به منظور مقایسه سطح لیزوزیم موکوس و پلاسمای در سه گونه Coho, Rainbow Trout و Atlantic Salmon انجام شد نشان داد میزان سطح لیزوزیم موکوس در رودخانه نسبت به دریا در هر سه گونه ماهی مورد مطالعه

بیشتر بوده است و همچنین با این که اختلاف معنی‌داری در میزان لیزوزیم سرم گزارش نشد اما در Atlantic Coho و Rainbow Trout لیزوزیم سرم در رودخانه نسبت به دریا بیشتر بود و در Atlantic Salmon برعکس بود. در بررسی حاضر، میزان لیزوزیم ماهی سفید دریای خزر بعد از مهاجرت از دریا به رودخانه جهت تخم‌ریزی افزایش یافته است. ماهی سفید از ماهیان رود کوچ بوده، در زمان مهاجرت انرژی بیشتری صرف تولید مثل و تنظیم اسمزی می‌کند، از طرف دیگر، ماهیت طبیعت رودخانه نسبت به دریا مستعد آلودگی بیشتر است، پس به نظر می‌رسد بالا رفتن میزان لیزوزیم و پروتئین تام در هنگام مهاجرت به رودخانه (اوایل اردیبهشت) به دلیل مقابله با شرایط مذکور است.

گزارش‌های اندکی وجود دارد که نشان دهنده حضور پروتئین‌های آنتی‌باکتریال در سرم یا موکوس ماهیان است (Yamamoto and Iida, 1995; Yano, 1996). همچنین گزارش شده است که در پوست ماهی Olive Flounder آنزیم‌هایی همچون آلکلاین فسفاتاز، استراز و پروتئاز شبه تریپسین (Palaksha و همکاران، ۲۰۰۸) و موکوس ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان چهار نوع پروتئین آنتی‌باکتریال (Smith و همکاران، ۲۰۰۰) حضور دارد که می‌توانند نقش ایمنی را ایفا کنند. در موکوس ماهی سفید هم سعی شده بود که پارامترهای ایمنی فوق‌الذکر که نوعی پروتئین هستند در قالب پروتئین تام بررسی شود و نتایج بیان‌کننده ارتباط نزدیک تغییرات پروتئین تام موکوس با تغییرات لیزوزیم در ماه‌ها و مراحل مختلف رشد بیضه است. به عبارتی این فاکتور همانند لیزوزیم تابعی از دمای آب، رشد گناد و شاید هم مهاجرت باشد.

با توجه به موارد ذکر شده در بالا و نتایج به دست آمده از ماهی سفید جنس نر دریای خزر و مقایسه آن با مطالعات انجام شده در دیگر گونه‌ها، به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که هر سه عامل دمای آب، مراحل رسیدگی جنسی و مهاجرت بر میزان فعالیت سیستم ایمنی غیر اختصاصی به خصوص لیزوزیم موثر هستند و به نظر می‌رسد که عامل دما تاثیر بیشتری بر میزان آن دارد.

منابع

- تکه ش. و ایمانپور م. ر. ۱۳۸۷. اثرات برخی صفات ثانویه جنسی روی خصوصیات زیستی مایع منی در ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901 پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره ۸۱، ۸-۱۵.
- Bradford M.M. 1976.** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254
- Dominguez M., Takemura A. and Tsuchiya M. 2005.** Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, **36**: 391-397.
- Ellis A.E. 1990.** Lysozyme assay. In: Stolen J.S., Fletcher D.P., Anderson B.S. and Robertson B.S. (eds). *Techniques in fish immunology*. Fair Haven, NJ, USA SOS Publication, pp: 101-103.
- Fast M.D., Sims D.E., Burka J.F., Mustafa A. and Ross N.W. 2002.** Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, Coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **132**: 445-457.
- Holloway Jr.H.L., Shoemaker C.A. and Ottinger C.A.1993.** Serum lysozyme levels in paddlefish and walleye. *Journal of Aquatic Animal Health*, **5**: 324-326.
- Hutchinson T.H. and Manning M.J. 1996.** Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda L.*) sampled from Lyme Bay. U.K. *Fish and Shellfish Immunology*, **6**: 473-482.
- Itami T., Takehara A., Nagano Y., Suetsuna K., Mitsutani A., Takesue K. and Takahashi Y. 1992.** Purification and characterization of lysozyme from ayu skin mucus. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**: 1937-1944.
- Kumari J., Sahoo P.K., Swain T., Sahoo S.K., Sahu B. and Mohanty B.R. 2006.** Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asia catfish *Clarias batrachus*. *Aquaculture*, **252**: 121-127.

- Langston A.L., Hoare R., Stefansson M., Fitzgerald R., Wergeland H. and Mulcahy M. 2002.** The effect of temperature on non-specific defense parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 61-76.
- Lie O., Evensen O., Sorensen A. and Froysadal E. 1989.** Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 6: 1-5
- Muona M. and Soivio A. 1992.** Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta* L.) during parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 106: 75-87.
- Nikoskelainen S., Bylund G. and Lilius E.M. 2004.** Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 581-592.
- Palaksha K.J., Shin G.W., Kim Y.R. and Jung T.S. 2008.** Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 24: 479-488.
- Safari R., Imanpuor M.R. and Shabanpoor B. 2009.** The effect of maturity stages of chemical composition of muscles *Rutilus frisii kutum* Kamenskii 1901 in Gorgan bay. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 16(1):28-34.
- Saurabh S.H. and Sahoo P.K. 2008.** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 38: 223-239.
- Smith V.J., Fernandes J.M.O., Jones S.J., Kemp G.D. and Tatner M.F. 2000.** Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*, 10: 243-260.
- Soltani M. and Pourgholam R. 2007.** Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharingodon idella*) following exposure to sublethal concentrations of organophosphate, diazinon. *Journal of Veterinary Research*, 62(2): 49-52.
- Studnika M, Siwicki A, Ryka B. 1986.** Lysozyme level in carp *Cyprinus carpio* L. *Bamidgeh*, 38: 22-25.
- Swain P., Dash S. and Sahoo P.K. 2007.** Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 38-43.

- Takemura A. and Takano K. 1995.** Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14: 415-421.
- Yamamoto A. and Iida T. 1995.** Non-specific defense activities of triploid rainbow trout. *Fish Pathology*, 30: 107-110.
- Yano T. 1996.** Non-specific immune system: humoral defense. In: *The Fish Immune System*. Iwama G. and Nakanishi T. (eds). Academic Press, 106-159.
- Yousif A.N., Albright L.J. and Evelyn T.P.T. 1991.** Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10: 45-49.

**Aquatic Physiology and
Biotechnology**
Vol. 1 No. 2, Winter 2014

The effects of temperature, sexual stages and migration on non-specific immune system in the serum and mucus of the male Caspian kutum with emphasis on lysozyme

Fariba Farzadfar¹, Behrooz Heidari^{2*}, Mahmoud Reza Aghamaali³

1- M.Sc.in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

Received: October 2013

Accepted: February 2014

Abstract

Non-specific immune system plays an important role in infections and prevent pathogens from growing and multiplying of. In the present study, lysozyme and total protein non-specific immune variations in during developmental testis in the male Caspian kutum were investigated. The samples monthly collected from Jefrood coast (Anzali, Guilan province, 37° 27' N; 49° 33' E) from October 2011 to May 2012. The blood and skin mucus were prepared in the laboratory. Lysozyme and total protein measurement performed by Turbidimetric and Bradford method. After identifying the various stages of the sperm development based on histological observations, the results showed that lysozyme levels had ascending trend during the sampling from October to January and after that, being descending up to March and finally, increased in May again. The concentration of mucus lysozyme showed significant ascending trend from October to December ($P<0.05$) and then simultaneously with lowering the Caspian Sea surface temperature until March, this trend became descending and finally lysozyme concentration increased after the fish migration to the river in May ($P<0.05$). Serum lysozyme levels from the early maturing of testis developmental stages to late maturing was ascendant and after that, in matured stage descended and after migrating to the river for spawning, lysozyme activity significantly increased. The changes in the mucosal lysozyme were similar to the serum ($P<0.05$). Total protein concentration showed significantly descending trend in the skin mucus from October to March ($P<0.05$). In May, it was increased significantly following the fish migration to river ($P<0.05$). The descendant trend was observed for total protein during the ovarian growth from early maturing to matured stages ($P<0.05$) but in the spawning stage, it was significantly increased ($P<0.05$). In conclusion, the results are showing the effects of temperature, testis development and migration on lysozyme variations of the Caspian kutum that between them, the temperature factor can be more highlighted.

Keywords: *Rutilus frisii kutum, Lysozyme, Turbidimetric*

*Corresponding Author: bheidari@guilan.ac.ir