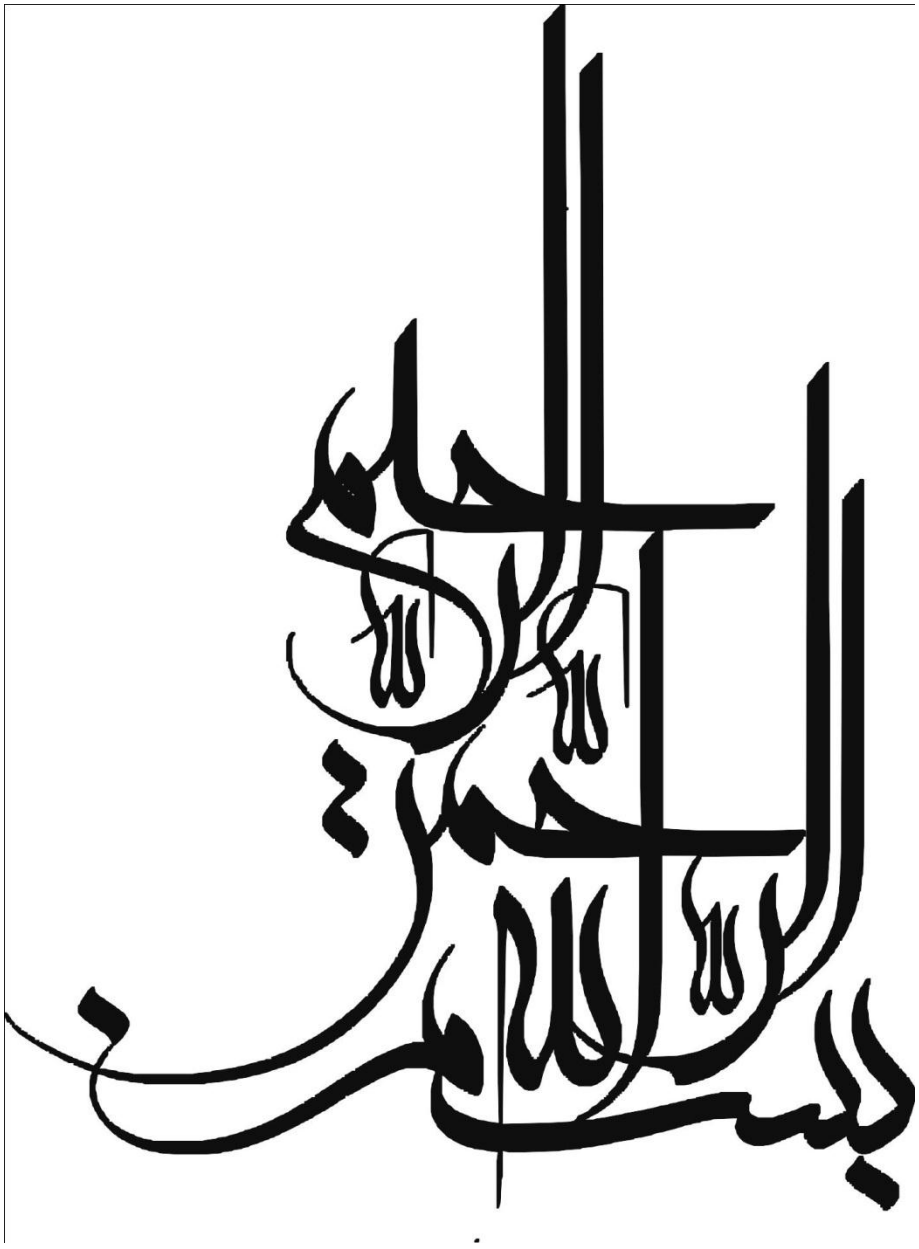

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه گیلان

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

عنوان: بررسی سیستم ایمنی غیر اختصاصی (همورال) و عوامل موثر بر آن در جنس نر ماهی سفید خزر (*Rutilus frisii kutum*)

از: فریبا فرزادفر

استاد راهنما: دکتر بهروز حیدری

استاد مشاور: دکتر محمود رضا آقامعالی

اسفند ۹۱

در نهایت عشق و سپاس

تقدیم به آنان که فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان سرمایه ی جاویدان زندگی من است:

پدر عزیزم

مادر بی نظیرم

و خواهر مهربانم

به پاس تمام زحمت ها، مهربانی ها و بزرگواریشان

به نام ایزدیگانه

سپاس پروردگار یکتا و مهربان را که هستی مان بخشید و خویشتن را به ما شناساند، خداوندی که روزگارمان را به حکمت رقم زد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود.

اینک که با لطف خداوند متعال موفق به گذراندن این دوره ی تحصیلی شدم، لازم می دانم از دستانی که دستم را در راه پیشبرد این رساله حمایت و هدایت کردند تشکر و قدردانی کنم.

در ابتدا از پدر و مادر عزیز و مهربانم که همواره پشتیبان من بودند و دعای خیرشان بدرقه ی راهم بوده و هست و از خواهر نازنینم که همواره مایه ی دلگرمی و آرامش خاطرم می باشد کمال تشکر را دارم.

از استاد راهنمای فرهیخته و بزرگوارم، جناب آقای دکتر بهروز حیدری به پاس رهنمود های علمی و حمایت های بی نظیرشان بی نهایت سپاسگزارم و خداوند متعال را شاکرم که افتخار فراگیری علم و ادب و اخلاق را در محضر ایشان داشتم و برایشان آرزوی توفیق روزافزون، سلامتی و شادکامی را دارم.

از استاد مشاور بزرگوارم، جناب آقای دکتر محمودرضا آقامعالی، به خاطر راهنمایی های ارزشمند و مساعدت های بی دریغشان صمیمانه تشکر می کنم.

از اساتید گرامی، جناب آقای دکتر نادر شعبانی پور و جناب آقای دکتر علی بانی که زحمت داوری پایان نامه ام را پذیرفتند و همچنین نماینده ی محترم تحصیلات تکمیلی سرکار خانم دکتر اکرم السادات نعیمی کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای مهندس طلوعی به دلیل حمایت های فراوان ایشان در پیشبرد این پایان نامه بسیار ممنون و سپاسگزارم.

از کارشناسان محترم گروه زیست شناسی به خصوص سرکار خانم هادوی عزیزم صمیمانه سپاسگزارم.

از دوست و هم گروهی عزیزم، سرکار خانم زمرد غفوری به خاطر همراهی های بی دریغشان، صمیمانه قدردانی می کنم.

از همکلاسی ها و دوستان خوبم خانم ها سودابه کاظمی، یاسمن آزادکار، فرخنده خانجانی و الهام عبدزاده و آقایان منصور کردی، حامد فرزانه و حسین رحمانی بسیار سپاسگزارم و تندرستی و موفقیت بسیار در تمام عرصه های زندگی را برایشان آرزومندم.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

چکیده فارسی ..... ز

چکیده انگلیسی ..... س

فصل اول / مقدمه و کلیات

مقدمه ۲

۱-۱ سیستم ایمنی ۲

۱-۲ لیزوزیم ۳

۱-۲-۱ مشخصات فیزیکوشیمیایی لیزوزیم ۳

۱-۲-۲ تولید و ترشح لیزوزیم ۴

۱-۲-۳ بافت های ترشح کننده ی لیزوزیم در ماهیان ۵

۱-۲-۳-۱ کلیه ۵

۱-۲-۳-۲ طحال ۵

۱-۲-۳-۳ کبد ۶

۱-۲-۴ فعالیت های زیستی لیزوزیم در ماهی ۶

۱-۲-۵ عوامل موثر بر فعالیت لیزوزیم ۷

۱-۳ پروتئین تام ۷

۱-۴ ماهی سفید دریای خزر ۸

۱-۴-۱ سیستماتیک ۸

۱-۴-۲بیولوژی ماهی سفید دریای خزر ۸
۱-۴-۳ مهاجرت ماهی سفید دریای خزر ۹
۱-۴-۴ مراحل رسیدگی جنسی ماهی سفید جنس نر دریای خزر ۱۰
۱- ۵ مروری بر مطالعات انجام شده ۱۱

فصل دوم / مواد وروشها

۲-۱ نمونه برداری و آماده سازی نمونه ها ۱۴
۲-۲- سنجش لیزوزیم به روش Turbidimetric ۱۴
۲-۲-۱ تهیه مواد مورد نیاز و آماده سازی محلول جهت سنجش میزان لیزوزیم ۱۴
۲-۲-۲ کشت باکتری ۱۵
۲-۲-۳ تهیه ی منحنی استاندارد ۱۶
۲-۲-۴ تست توربیدیمتریک سرم خون و مخاط پوست ۱۷
۲-۲-۵ تست توربیدیمتریک بافت های کلیه، کبد و طحال ۱۷
۲-۲-۵-۱ تهیه ی عصاره های بافتی ۱۷
۲-۲-۵-۲ سنجش لیزوزیم بافت ها ۱۸
۲-۳ مورفو هیستولوژی اندام جنسی نر ۱۸
۲-۳-۱آماده سازی بافت ها و تعیین رسیدگی جنسی ۱۸
۲-۴ سنجش پروتئین تام ۲۰
۲- ۵ آنالیز داده ها و مقایسه ی آماری ۲۱

فصل سوم / نتایج و بحث

۳-۱ مراحل مختلف رسیدگی جنسی در جنس نر ماهی سفید دریای خزر ۲۳
۳-۱-۱ مرحله‌ی بلوغ اولیه (Early Maturing) ۲۳
۳-۱-۲ مرحله‌ی بلوغ ثانویه (Late Maturing) ۲۳
۳-۱-۳ مرحله‌ی بالغ (Developed) ۲۳
۳-۱-۴ مرحله‌ی اسپرم ریزی (Spermiation) ۲۳
۳-۲ تغییرات میزان لیزوزیم طی ماه های نمونه برداری و پیشرفت رشد بیضه ۲۶

۳-۲-۱ لیزوزیم سرم خون جنس نر ماهی سفید خزر ۲۶
۳-۲-۱-۱ تغییرات غلظت لیزوزیم سرم خون طی ماه های نمونه برداری ۲۶
۳-۲-۱-۲ تغییرات غلظت لیزوزیم سرم خون طی روند رشد بیضه ۲۶
۳-۲-۲ لیزوزیم مخاط پوست جنس نر ماهی سفید خزر ۲۸
۳-۲-۲-۱ تغییرات غلظت لیزوزیم مخاط پوست طی ماه های نمونه برداری ۲۸
۳-۲-۲-۲ تغییرات غلظت لیزوزیم مخاط پوست طی روند رشد بیضه ۲۸
۳-۲-۳ لیزوزیم کلیه جنس نر ماهی سفید خزر ۳۰
۳-۲-۳-۱ تغییرات غلظت لیزوزیم بافت کلیه طی ماه های نمونه برداری ۳۰
۳-۲-۳-۲ تغییرات غلظت لیزوزیم بافت کلیه طی پیشرفت رشد بیضه ۳۰
۳-۲-۴ لیزوزیم کبد جنس نر ماهی سفید خزر ۳۱
۳-۲-۴-۱ تغییرات غلظت لیزوزیم بافت کبد طی ماه های نمونه برداری ۳۱
۳-۲-۴-۲ تغییرات غلظت لیزوزیم بافت کبد طی روند رشد بیضه ۳۱
۳-۲- ۵ لیزوزیم طحال جنس نر ماهی سفید خزر ۳۳
۳-۲-۵-۱تغییرات غلظت لیزوزیم بافت طحال طی ماه های نمونه برداری ۳۳
۳-۲-۵-۲ تغییرات غلظت لیزوزیم بافت طحال طی روند رشد بیضه ۳۳
۳-۳ تغییرات میزان پروتئین تام طی ماه های نمونه برداری و پیشرفت رشد بیضه ۳۵
۳-۳-۱ پروتئین تام مخاط پوست جنس نر ماهی سفید خزر ۳۵
۳-۳-۱-۱ تغییرات غلظت پروتئین تام مخاط پوست طی ماه های نمونه برداری ۳۵
۳-۳-۱-۲تغییرات غلظت پروتئین تام مخاط پوست طی روند رشد بیضه ۳۵
۳-۳-۲ پروتئین تام کلیه جنس نر ماهی سفید خزر ۳۷
۳-۳-۲-۱ تغییرات غلظت پروتئین تام بافت کلیه طی ماه های نمونه برداری ۳۷
۳-۳-۲-۲ تغییرات غلظت پروتئین تام بافت کلیه طی روند رشد بیضه ۳۷
۳-۳-۳ پروتئین تام کبد جنس نر ماهی سفید خزر ۳۸
۳-۳-۳-۱ تغییرات غلظت پروتئین تام بافت کبد طی ماه های نمونه برداری ۳۸

۳-۳-۳-۲ تغییرات غلظت پروتئین تام بافت کبد طی روند رشد بیضه ۳۸
۳-۳-۴ پروتئین تام طحال جنس نر ماهی سفید خزر ۴۰
۳-۳-۴-۱ تغییرات غلظت پروتئین تام بافت طحال طی ماه های نمونه برداری ۴۰
۳-۳-۴-۲ تغییرات غلظت پروتئین تام بافت طحال طی روند رشد بیضه ۴۰
۳-۴ بحث ۴۴
۳-۴-۱ بحث تاثیر نوسانات دما (ماه های مختلف سال) بر فعالیت لیزوزیم سرم، مخاط و بافت ها ۴۵
۳-۴-۲ بحث تاثیر روند رشد بیضه بر فعالیت لیزوزیم سرم، مخاط و بافت ها ۴۶
۳-۴-۳ مقایسه ی محتوی لیزوزیم سرم، مخاط و بافت های کلیه، کبد و طحال ۴۹
۳-۴-۴ بحث سنجش پروتئین تام مخاط پوست و بافت های کلیه، کبد و طحال ۴۹
۳-۴-۵ مقایسه سطح فعالیت سیستم ایمنی ماهی سفید جنس نر و ماده ی دریای خزر ۵۰
۳-۴-۶ جمع بندی و پیشنهادات ۵۰
منابع ۵۲
پیوست ها ۵۹

فهرست اشکال

شکل۱-۱ ساختار مولکول لیزوزیم ۴

شکل۱-۲عملکرد لیزوزیم ۶

شکل ۱-۳ ماهی سفید جنس نر دریای خزر ۸

شکل۱-۴ برجستگی های سفید جنسی نمایان شده بر روی ناحیه ی سر ماهی سفید نر در فصل تولید مثل ۹

شکل۲-۱ دستگاه فریز درایر مربوط به تهیه ی باکتری خشک و جامد ۱۶

شکل۲-۲ دستگاه اسپکتروفتومتر مربوط به سنجش لیزوزیم ۱۷

شکل۲-۳ دستگاه سونیکاتور مربوط به تهیه ی عصاره ی بافتی ۱۸

شکل ۳-۱ تصویر a : بیضه ی ماهی در مرحله‌ی بلوغ اولیه، تصویرb : بیضه ی ماهی در مرحله‌ی بلوغ ثانویه ۲۴

شکل ۳-۲ دو تصویر از مرحله ی بالغ ماهی سفید جنس نر ۲۴

شکل ۳-۳ دو تصویر از مرحله ی اسپرم ریزی ۲۵

شکل ۳-۴ساختار ماکروسکوپی بیضه ماهی سفید خزر ۲۵

شکل۳-۵ تغییرات لیزوزیم اندازه گیری شده سرم خون ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۲۷

شکل۳-۶ تغییرات لیزوزیم اندازه گیری شده سرم خون ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۲۷

شکل ۳-۷ تغییرات لیزوزیم اندازه گیری شده مخاط پوست ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۲۹

شکل۳-۸ تغییرات لیزوزیم اندازه گیری شده مخاط پوست ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۲۹

شکل۳-۹ تغییرات لیزوزیم اندازه گیری شده کلیه ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۳۰

شکل۳-۱۰ تغییرات لیزوزیم اندازه گیری شده کلیه ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۳۱

شکل۳-۱۱ تغییرات لیزوزیم اندازه گیری شده کبد ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۳۲

شکل۳-۱۲ تغییرات لیزوزیم ا ندازه گیری شده کبد ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۳۲

شکل۳-۱۳ تغییرات لیزوزیم ا ندازه گیری شده طحال ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۳۴

شکل۳-۱۴ تغییرات لیزوزیم اندازه گیری شده طحال ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۳۴

شکل۳-۱۵ تغییرات پروتئین تام اندازه گیری شده مخاط پوست ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۳۶

شکل ۳-۱۶- تغییرات پروتئین تام اندازه گیری شده مخاط پوست ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۳۶
شکل۳-۱۷- تغییرات پروتئین تام اندازه گیری شده کلیه ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۳۷
شکل ۳-۱۸ تغییرات پروتئین تام اندازه گیری شده کلیه ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۳۸
شکل ۳-۱۹ تغییرات پروتئین تام اندازه گیری شده کبد ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۳۹
شکل ۳-۲۰ تغییرات پروتئین تام اندازه گیری شده کبد ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۳۹
شکل ۳-۲۱ تغییرات پروتئین تام اندازه گیری شده طحال ماهی سفید طی ماه های مختلف سال ۴۱
شکل ۳-۲۲ تغییرات پروتئین تام اندازه گیری شده طحال ماهی سفید طی روند رشد بیضه ۴۱

فهرست جداول

جدول۲-۱ نحوه ی تهیه ی منحنی استاندارد جهت سنجش پروتئین تام ۲۱

جدول ۳-۱ میانگین مقادیر لیزوزیم اندازه گیری شده به صورت ماهانه و طی روند رشد بیضه ۴۲

جدول ۳-۲ میانگین مقادیر پروتئین تام اندازه گیری شده به صورت ماهانه و طی روند رشد بیضه..... ۴۳

چکیده

بررسی سیستم ایمنی غیر اختصاصی (همورال) و عوامل موثر بر آن در جنس نر ماهی سفید خزر (*Rutilus frisii kutum*).

فریبا فرزادفر

ماهی سفید از ماهیان استخوانی متعلق به خانوادهی Cyprinidae، جنس *Rutilus* با نام علمی *Rutilus frisii kutum* از ماهیان بومی دریای خزر است. به منظور مطالعه اثرات مراحل مختلف رشد بیضه و تغییرات دما بر میزان لیزوزیم و پروتئین تام سرم خون، مخاط پوست و بافت های کلیه، کبد و طحال، نمونه برداری ماهانه (مهر ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ۱۳۹۱) از منطقه ی جفرود انزلی صورت پذیرفت. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه سرم خون و مخاط پوست از آن ها تهیه و جهت تهیه ی عصاره های بافتی بافت های مذکور از ماهی جدا و به منظور انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۷۰°C- نگهداری شد. پس از تشخیص مراحل مختلف رسیدگی جنسی، میزان لیزوزیم و پروتئین تام به ترتیب با استفاده از روش توربیدیمتریک و بردفورد اندازهگیری گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که لیزوزیم سرم و بافت ها طی ماه های نمونه برداری از مهر تا دی روند صعودی دارد و بعد از آن تا اسفند نزول پیدا کرده و نهایتا تا اردیبهشت افزایش می یابد. میزان لیزوزیم مخاط پوست تا ماه آذر روند صعودی معنی داری داشته ($P<0.05$) و سپس تا ماه اسفند طی کاهش دمای آب روند نزولی را طی کرد و در اوایل اردیبهشت به طور معنی داری افزایش یافت ($P<0.05$). غلظت لیزوزیم سرم، مخاط و بافت های کبد و طحال طی پیشرفت رشد بیضه از مرحله ی رشد اولیه تا رشد ثانویه روند صعودی دارد و سپس در مرحله ی بالغ نزول یافته (به جز کلیه) و مجددا در مرحله ی اسپرم ریزی با مهاجرت به رودخانه افزایش می یابد، به طوری که این افزایش در بافت ها چشمگیر می باشد. پروتئین تام نیز روندی مشابه با لیزوزیم (به جز کلیه) را پیمود. نتایج به دست آمده در این بررسی حاکی از اثر دما و رسیدگی جنسی بر سطح لیزوزیم ماهی سفید می باشد به طوری که دما تاثیر سریع تری بر مخاط و عوامل دخیل در رشد بیضه، بر لیزوزیم سرم و بافت ها را دارد.

کلید واژه : ماهی سفید دریای خزر، لیزوزیم، توربیدیمتریک

Abstract

Study of non-specific immune system (humoral) and effective parameters on it in male Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*).

Fariba Farzadfar

Kutum (*Rutilus frisii kutum*) belongs to Cyprinidae family and genous *Rutilus* , an endemic species to the Caspian Sea. In the present study, lysozyme and total protein variations of non-special immune system during developmental stages of testis in the Caspian kutum were investigated under environmental conditions. The samples were taken over a period of eight months **(**from October to May, 2012) from Anzali zone, Jefrood. blood, skin mucus and tissues samples were prepared and stored at -70° c for further analysis. After determining various stages of testis development based on histological observations, Lysozyme activity and total protein content were determined using Turbidimetric test and Bradford method. Results showed that serum and tissue lysozyme levels had ascending trend during the sampling from October to January and after that, decreased until March and finally increased in May again. The concentration of mucus lysozyme showed significant increase from October to December ($P<0.05$) and then together with decline in surface temperature of the Caspian Sea until March, this trend became descending and finally lysozyme content increased after the fish migration to the river in May ($P<0.05$). Tissue, mucus and serum lysozyme levels from the early maturing to late maturing were ascendant and after that, it was descended in developed stage (with the exception of kidney) and finally after migrating to the river for spermiation, lysozyme activity significantly increased. The changes in the total protein were similar to the lysozyme (with the exception of kidney). In conclusion, the results showed the effects of temperature, testis growth and migration on lysozyme variations of the Caspian kutum. for mucus, the temperature have faster effect on mucus, while the levels of lysozyme in serum and tissues are more affected by testis development.

Keyword: *Rutilus frisii kutum*, Lysozyme, Turbidimetric.

فصل اول
مقدمه و کلیات

۱- مقدمه

اهمیت ماهیان به عنوان منبع پروتئین حیوانی که دارای ویژگی انحصاری و برتر از گوشت قرمز می باشد، در تغذیه و اقتصاد جهانیان از سپیده دم تاریخ تاکنون همواره برقرار بوده است، تقاضای روز افزون بشر برای مصرف این محصولات از طرفی و کاهش ذخایر وحشی این جانور از طرف دیگر، موجب تلاش های زیادی برای توسعه ی صنعت آبزی پروری در دنیا شده است که متاسفانه همزمان با رشد این صنعت، مشکل بیماری های عفونی خسارت زا به عنوان یکی از موانع رشد، بروز کرده است. با توجه به این که بیماری های آبزیان به علت سهولت جابه جایی موجودات آبزی به سرعت در نقاط مختلف جهان انتشار می یابند و از طرف دیگر آن دسته از بیماری ها که به طور معمول در سایر دام ها قابل درمان اند، به علت ماهیت آبزی بودن به سادگی درمان پذیر نیست، بهره گیری از اصول ایمنی دارای اهمیت به سزایی در این جانوران می باشد [سلطانی، ۱۳۸۷]. ایمنی یک مکانیسم دفاعی مهم فیزیولوژیکی بر علیه عفونت ها و ثابت نگه دارنده ی هموستاز داخلی بدن می باشد [Sahoo *et al.*, 2005].

۱-۱- سیستم ایمنی

سیستم ایمنی در ماهیان همانند سایر مهره داران دیگر نقش مهمی در حفاظت جاندار بر علیه پاتوژن ها را ایفا می نماید [Sawin *et al.*, 2007] که به دو دسته ی ایمنی غیر اختصاصی که یک مکانیسم دفاعی ذاتی است و ایمنی اختصاصی تقسیم می شود [Kumari *et al.*, 2006]. سیستم ایمنی غیر اختصاصی از نظر تکامل نژادی قدیمی تر از سیستم ایمنی اختصاصی بوده و در همه ی ارگانیسم های چند سلولی یافت شده در حالی که سیستم ایمنی اختصاصی در حدود ۴۵۰ میلیون سال پیش پدید آمده و در همه ی مهره داران به جز ماهیان بدون آرواره یافت شده است [Saurabh and Sahoo, 2008]. از طرفی سیستم ایمنی غیر اختصاصی یا ذاتی سریع تر از سیستم ایمنی اختصاصی در پاسخ به عفونت ها عمل می نماید [Saurabh and Sahoo, 2008]. ایمنی غیر اختصاصی نه تنها در مراحل لاروی بلکه در تمام طول حیات جانور وجود دارد و حتی در مواقع تضعیف یا نقص ایمنی اختصاصی، نقش حفاظتی و جبرانی ایفا نموده و ماهی را در برابر عوامل بیماری زا و شرایط نامناسب محیطی محافظت می نماید [سلطانی، ۱۳۸۷]. سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان به عنوان اولین خط دفاعی در برابر طیف وسیعی از پاتوژن ها عمل می نماید و اهمیت آن در ماهیان بیشتر از پستانداران گزارش شده است [Saurabh and Sahoo, 2008].

ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان و مهره داران بالاتر، شامل ایمنی غیر اختصاصی هومورال و ایمنی غیراختصاصی سلولی می باشد [Ellis, 1999]. ایمنی غیر اختصاصی هومورال شامل: لیزوزیم، سیستم عامل مکمل، لکتین، اینترفرون، ترانسفرین، پروتئین های فاز حاد و مواد دیگر از جمله همولیزین، پروتئیناز، آلفا ماکروگلوبولین و آلفا پرسی پیتین [1]می باشد [سلطانی، ۱۳۸۷]. لیزوزیم به عنوان یکی از مهمترین مولکول های دفاعی در سیستم ایمنی غیر اختصاصی هومورال می باشد [Saurabh and Sahoo, 2008].

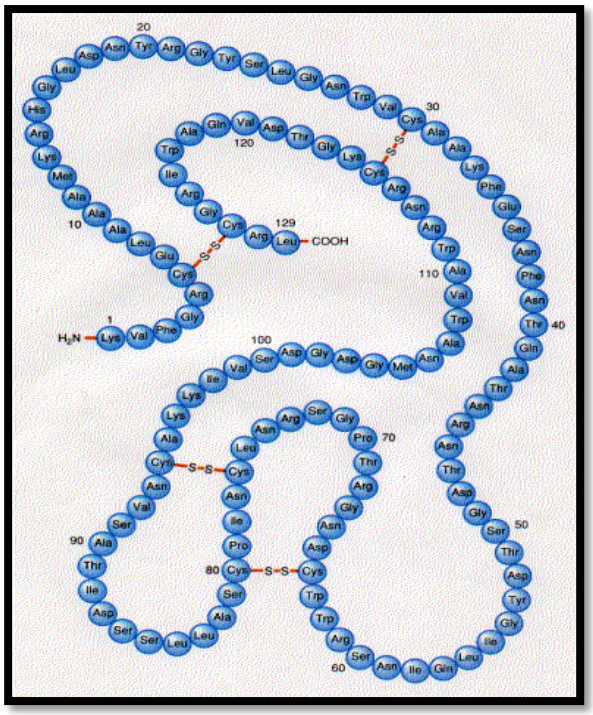
۱-۲- لیزوزیم

لیزوزیم در طیف وسیعی از مهره داران از جمله گونه های آب شیرین و دریایی وجود دارد [Osserman *et al*., 1974] و از آن به عنوان داروی ضد باکتریایی نام می برند. لیزوزیم در ماهیان نقش مهمی در مکانیسم های دفاعی بر علیه بیماری های عفونی را ایفا می نماید [Fange *et al*., 1976; Murray and Fletcher, 1976; Lundblad *et al*., 1979; Lindsay, 1986; Lie *et al*., 1989].

۱-۲-۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی لیزوزیم

لیزوزیم یک پلی پپتید تقریبا ۱۲۰ اسید آمینه ای (شکل ۱-۱) با وزن مولکولی پایین، بین ۱۴ تا ۱۸ کیلودالتون می باشد [Itami *et al*., 1992; Yousif *et al*., 1991]. فعالیت مطلوب لیزوزیم ماهیان در pH ۵/۵ تا ۷/۵ است و در pH با دامنه ی ۴/۸ تا ۹/۲ نیز فعالیت آن ها ذکر شده است. البته اختلافاتی در pH مطلوب برای فعالیت آن در بین ماهیان آب شیرین و دریایی وجود دارد [سلطانی، ۱۳۸۷]. بیشترین فعالیت لیزوزیم در ماهیان آب شیرین در pH ۵/۴ در صورتی که بیشترین فعالیت آن در ماهیان دریایی در pH ۶/۲ و همچنین در ۹/۲ گزارش شده است [Sankaran and Gunani, 1972]. درجه حرارت مطلوب برای فعالیت لیزوزیم در بسیاری از ماهیان و البته در بافت های مختلف به صورت متغیر گزارش شده است [Iwama and Nakanishi, 1996]. لیزوزیم در pH اسیدی در درجه حرارت های بالا فعال بوده اما در محیط های قلیایی غیر فعال می باشد [Salton, 1957; Jolles, 1969].

[1] à- Precipitin



شکل ۱-۱- ساختار مولکول لیزوزیم [WWW.textbookofbacteriology. net]

۱-۲-۲- تولید و ترشح لیزوزیم

این آنزیم از گرانول های گلبول های سفید منتشر در گردش خون و بیشتر توسط نوتروفیل ها، مونوسیت ها و کمتر توسط ماکروفاژها [Murray and Fletcher, 1976; Saurabh and Sahoo, 2008] و همچنین بافت های غنی از لکوسیت ها از جمله قسمت قدامی کلیه، مخاط پوست، طحال، کبد، آبشش و دستگاه گوارش ترشح می شود؛ این محل ها در ماهیان بیشتر از سایر مناطق مورد تهاجم باکتری ها قرار می گیرد [Grinde *et al*., 1988; Kawahara and Kusuda, 1988; Oohara *et al*., 1991; Yusif *et al*., 1991; Holloway *et al*., 1993]. همچنین تخم برخی ماهیان تمرکز بالایی از لیزوزیم را نشان داده است، به طوری که میزان لیزوزیم در تخم برخی گونه های آزاد ماهیان مانند ماهی آزاد اطلس و قزل آلای رنگین کمان تا ۱۹۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نیز اندازه گیری شده است [Iwama and Nakanishi, 1996]. به نظر می رسد میزان لیزوزیم در کلیه و دیگر بافت های غنی از این آنزیم در بدن مادر افزایش یافته و از طریق سرم خون به تخم انتقال می یابد [Yusif *et al*., 1991].

۱-۲-۳- بافت های ترشح کننده ی لیروزیم در ماهیان

حضور آنزیم لیزوزیم و توزیع آن در اندام های احشایی از جمله کلیه، طحال و کبد بستگی به فیلوژنی ماهی دارد [Subbotkina and Subbotkin, 2003]. اختلاف عمده ی سیستم ایمنی از نظر تشریحی بین ماهی و پستانداران، فقدان مغز استخوان و گره های لنفاوی است. تیموس، کلیه و طحال بافت های اصلی لنفوئیدی در ماهیان استخوانی حقیقی هستند [Iwama and Nakanishi, 1996].

۱-۲-۳-۱- کلیه

کلیه های بسیاری از ماهیان، اندامی باریک، طویل و به رنگ قرمز تیره هستند که در امتداد ناحیه ی پشتی دیواره ی بدن، درست در زیر ستون مهره ها کشیده شده اند [ستاری، ۱۳۸۹]. کلیه به عنوان اندام خونساز اصلی به ویژه در ماهیان استخوانی و منبعی برای سلول های اجدادی است [Zapata and Cooper, 1990]. عقیده بر این می باشد که کلیه در ماهیان مشابه مغز استخوان در پستانداران است [Balabanova and Matei, 1985]. به علاوه عملکرد مهمی به عنوان اندام لنفوئیدی ثانویه نیز دارد. بر اساس معیار بافت شناسی، کلیه به سه بخش قدامی، میانی و خلفی تقسیم بندی می شود که قسمت خلفی آن، بیشتر حاوی ساختمان های لوله ای و ادراری است و در ترشح مواد دفعی نقش دارد، و قسمت قدامی کلیه سرشار از ماکروفاژها، لنفوسیت ها، نوتروفیل ها، مقداری ائوزینوفیل و بازوفیل است [Iwama and Nakanishi, 1996]. از آن جایی که لکوسیت های متمرکز در آن به ویژه ماکروفاژها و همچنین اجزای تشکیل دهنده ی آن ها قادر به سنتز لیزوزیم می باشند [Gutkin *et al*., 1984]، و از طرفی کلیه یک نقش تنظیمی در نگهداری سطح لیزوزیم ارگانیسم ها را نیز دارد ، به عنوان یک اندام مهم در سیستم دفاعی محسوب می شود [Subbotkina and Subbotkin, 2003].

۱-۲-۳-۲- طحال

معمولا طحال رنگ قرمز تیره دارد و غالبا هرمی شکل است. این اندام در ماهیان بر روی معده یا در پشت آن قرار می گیرد [ستاری، ۱۳۸۹]. طحال ماهیان، مرکب از سلول های خونی، سلول های رتیکولار، ماکروفاژ ها و مراکز ملانوفاژی است که در ساختمانی از پولپ سفید، قرمز و تشکیلات مویرگی قرار دارند [Iwama and Nakanishi, 1996]. در ماهیان استخوانی طحال آخرین اندامی است که طی تشکیلات بافت لنفوئیدی، تکامل پیدا می کند و یک اندام لنفوئیدی ثانویه بوده و در مقایسه با کلیه نقش طحال در سیستم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی ثانویه است [Fange and Nilsson, 1985].

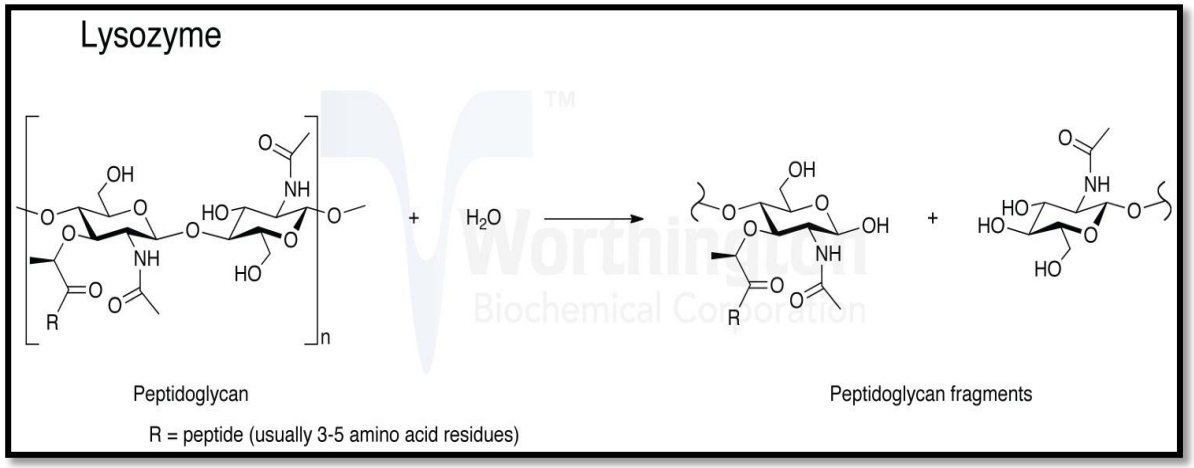
۱-۲-۳-۳- کبد

این اندام مشخصا دارای دو قطعه (لوب) است، که البته در ماهی آزاد تنها یک قطعه و ماکرل سه قطعه دارد [ستاری، ۱۳۸۹]. کبد نیز همانند کلیه و طحال یک اندام خون ساز، البته با نقشی کم رنگ تر، در انواعی از ماهیان محسوب می گردد [Lozovoi and Shergin, 1981]. گفته می شود کبد نیز در سیستم دفاعی نقش داشته که در ماهیان مختلف، اهمیت دفاعی آن متفاوت گزارش شده است [Subbotkina and Subbotkin, 2003].

۱-۲-۴- فعالیت های زیستی لیزوزیم در ماهی

این آنزیم قادر به شکستن پیوند گلیکوزیدی، از زنجیره بتای۱و۴ N- استیل مورامیک اسید و N- استیل گلوکزآمین[۱] لایه ی پپتیدوگلیکان[۲] (شکل ۱-۲) در دیواره سلولی باکتری ها ی گرم مثبت است [Salton and Ghuysen, 1959].

باکتری گرم منفی نیز گرچه به طور مستقیم تحت تاثیر لیزوزیم قرار نمی گیرند اما این آنزیم پس از عمل عامل مکمل و سایر آنزیم هایی که موجب ایجاد سوراخ در دیواره ی سلولی باکتری می شوند، با اثر بر لایه ی پپتیدوگلیکان انهدام باکتری های گرم منفی را تسریع می بخشد [Yano, 1997; Neeman *et al*., 1974]. همچنین این آنزیم موجب تسهیل عمل بیگانه خواری سلول های فاگوسیت کننده می شود [Soltani and Purgholami, 2007]. طبق گزارش های Salton در سال 1957 و Jolles در سال 1969، لیزوزیم، موجب لیز کردن دیواره ی سلولی باکتری *Micrococcus lysodiekticus* می شود.



شکل۱-۲- عملکرد لیزوزیم [www.sworthington-biochem.com]

[۱] ß (1→4) N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine

[۲] Peptidoglycan layer

۱-۲-۵- عوامل موثر بر فعالیت لیزوزیم

مطالعات نشان می دهد عوامل متعددی بر میزان و نیز قدرت ضد باکتریایی لیزوزیم بافت های مختلف ماهیان تاثیر گذار است، که از آن جمله می توان به فصل، جنسیت، گونه، سن، عوامل کیفی آب به ویژه درجه حرارت، تغذیه و عوامل استرس زا اشاره کرد [Saurabh and Sahoo, 2008]. تغییر در درجه ی حرارت مطلوب فیزیولوژی ماهیان، موجب تغییر در میزان لیزوزیم بافت ها و ترشحات موکوسی پوست می شود. وارد کردن استرس به ماهی مانند افزایش تراکم، افزایش دستکاری، عوامل محیطی نامساعد نظیر سموم و داروها، همگی اثرات منفی برسطح لیزوزیم سرم، موکوس و بافت های ماهیان دارد. اما برخی عوامل نظیر مواد محرک ایمنی مانند گلوکان ها، واکسن ها وآنتی ژن ها موجب افزایش سطح لیزوزیم در بافت های ماهیان می شود [سلطانی، ۱۳۸۷]. فعالیت لیزوزیم به درجه ی استرس، مدت و نوع آن بستگی دارد [Yildiz., 2006]. به علاوه عناصر مغذی نیز نقش مهمی بر میزان فعالیت لیزوزیم موجود در بافت ها را ایفا می نماید [سلطانی، ۱۳۸۷]. اخیرا گزارش شده است هورمون های دخیل در فرایند رشد گناد، فعالیت سیستم ایمنی را نیز تحت تاثیر قرار می دهد، به طوری که Rohlenova و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند افزایش سطح 11- Ketotestosteron، هورمون دخیل در فرایند اسپرماتوژنز در جنس نر، بر فعالیت سیستم ایمنی تاثیر گذار است.

۱-۳- پروتئین تام

در مهره داران و بی مهره گان، پروتئین ها و پپتید های آنتی باکتریال نقش مهمی به عنوان اولین سد دفاعی بدن در برابر عوامل پاتوژن و بیماری زا را ایفا می نمایند [Villarroel *et al*., 2007]. این پروتئین ها در سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهیان نیز وجود دارد که می تواند توان ایمنی آن ها را بالا ببرد [Valerie *et al*., 2000]. گزارشات اندکی وجود دارد که نشان دهنده حضور این پروتئین ها در سرم یا موکوس ماهیان است [Yamamoto and Iida, 1995; Yano,1996]. با این حال گزارش شده است که در پوست ماهیolive flounder آنزیمهایی همچون آلکلاین فسفاتاز، استراز و پروتئاز trypsin-like [Palaksha *et al*., 2008] حضور دارد که می توانند نقش ایمنی را ایفا کنند.