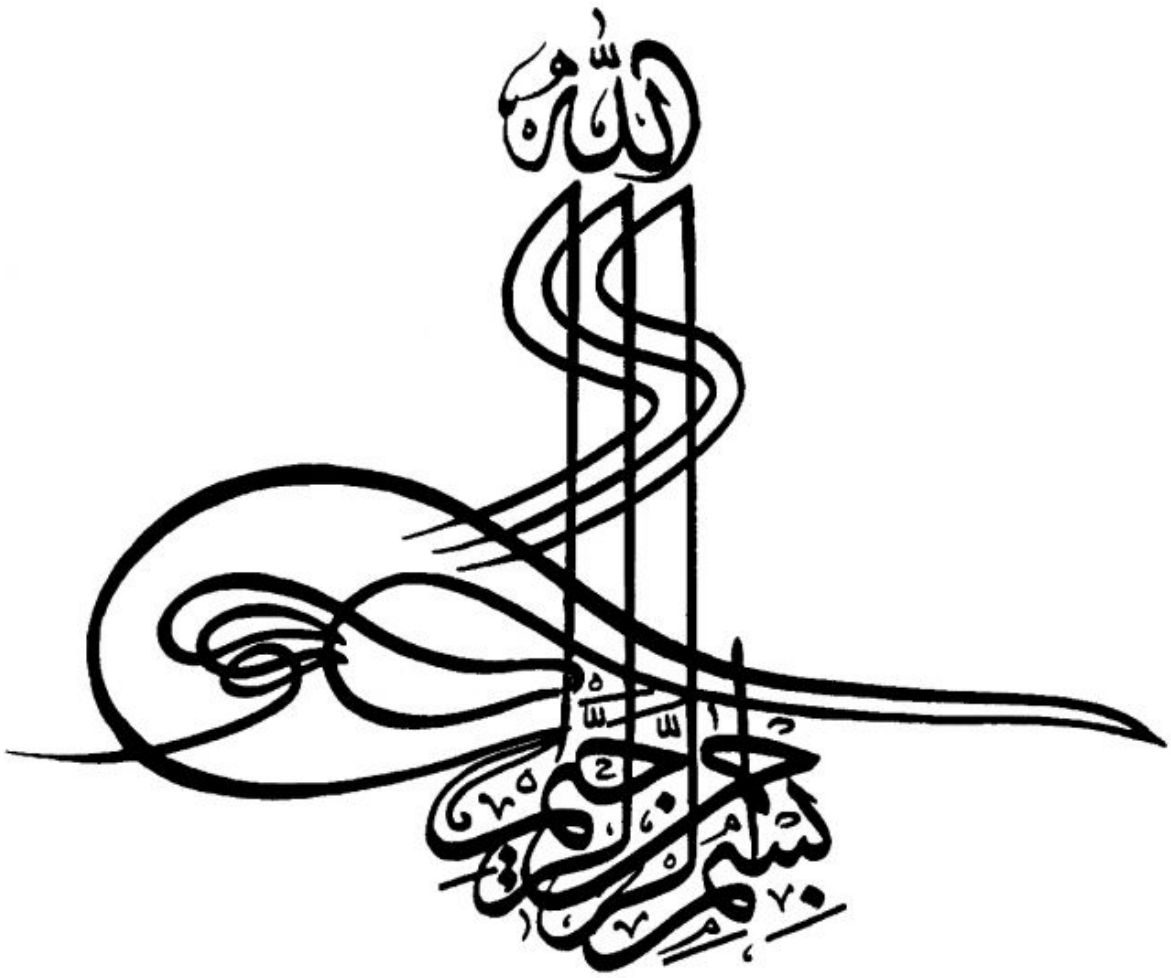
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تبریز

دانشکده دامپزشکی

گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان

پایان نامه:

برای دریافت درجه دکتری حرفه ای دامپزشکی

عنوان:

مطالعه اثر جلبک ارگوسان بر سیستم ایمنی غیر اختصاصی در موکوس پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*)

اساتید راهنما :

دکتر نجمه شیخ زاده

دکتر کتایون نفوذی

استاد مشاور:

دکتر مرضیه حیدریه

پژوهشگر:

عاطفه کریمی پاشاکی

مرداد 1390

...می گویند که ما همه کوزه سفالین یک استادیم و مظروفمان باده (نفخت من روحی)،

همه در یک جاده مستقیم و رو به یک چهره عاشقیم، این است راز عالم...

در این میانه جرعه ای برگرفتم به قدر ظرف خویش!بارالها

کوشیدم تا تو را باز شناسم از میان هر آنچه گرداگردم را فرا گرفته است.

حالی که می دانم هر دم در چهره ای رخ می نمایی و به جامه ای در می آیی و من به همان چهره

عشق می ورزم و همان جامه بر تن احساسم می کشم...

من در آیینه شفاف کتاب

در شبستان دلم

کنج محراب دعا

در نمازی ابدی

بارالها , به تو سوگند تو را مبینم

...تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

آنانکه هستی خویش را سرمایه وجودم کردند و

الفبای زیستن را به من آموختند و

راه تحصیل علم را برایم هموار نمودند.

...و صمیمی ترین همراهانم

در فراز و نشیب های زندگی

برادر و خواهرم

که همیشه مشوق و همراهم بودند

چگونه زیستن را به لطف خدا با هم تجربه کردیم

با تشکر وقدر دانی از

استاد بزرگوارم

سرکار خانم دکتر نجمه شیخ زاده

که افق جدیدی را در برابر دیدگانم گشودند و

همواره از راهنمائی های ارزشمندشان بهره مند بوده ام

وسرکار خانم دکتر کتایون نفوذی

که از راهنمائی های ارزنده و بی دریغ ایشان بسیار آموختم

وسرکار خانم دکتر مرضیه حیدریه

به پاس مشاوره و همکاری صمیمانه ایشان در انجام این پژوه

همچنین بر خود لازم می دانم از استاد بزرگوار

جناب آقای دکتر جعفری جوزانی

که جهت داوری و مطالعه این پایان نامه قبول زحمت نمودند

قدردانی و تشکر نمایم.

و همچنین از جناب آقای دکتر طایفی هم که در جای جای این پژوهش از راهنمائی ارزنده شان بر خوردار شدم نیز کمال تشکر را دارم

با تشکر فراوان از کارشناس بخش میکروبیولوزی جناب آقای مفتونی وسرکارخانم جعفری که در تمام مراحل پژوهش از لطف و کمک های بی دریغشان بهره مند بوده ام.

و سپاس فراوان از کلیه پرسنل دانشکده دامپزشکی در تحصیلات تکمیلی، معاونت پژوهشی، آموزش، آزمایشگاهها، کتابخانه، سایت کامپیوتری، تاسیسات و خدمات.

نام خانوادگی دانشجو :کریمی پاشاکی **نام :**عاطفه

عنوان پایان نامه/ رساله :مطالعه اثر جلبک ارگوسان بر سیستم ایمنی غیر اختصاصی در موکوس پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان (*onchorhynchus mykiss*)

استاد (استادان) راهنما : خانم دکتر نجمه شیخ زاده (استاد راهنمای اول)– خانم دکتر کتایون نفوذی(استاد راهنمای دوم)

استاد (استادان) مشاور: خانم دکتر مرضیه حیدریه

مقطع تحصیلی: دکتری حرفه ای **رشته**: دکتری حرفه ای دامپزشکی **گرایش**: دامپزشکی دانشگاه: تبریز **دانشکده** : دامپزشکی **تاریخ فارغ التحصیلی**:26 مرداد1390 تعداد **صفحه**: 47

کلید واژه ها: (واژه هائی که بیانگر موضوع پایان نامه است): موکوس پوست ،ماهی قزل آلای رنگین کمان ،ارگوسان ،ایمنی مخاطی جلدی ،یرسینیا راکری

چکیده: (این قسمت حداکثر در دو صفحه تایپ شود)

در این مطالعه، تاثیر تغذیه جلبک ارگوسان بر ایمنی مخاطی در پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان بررسی شد. 60 ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن 100-110 گرمی به طور تصادفی به 2 گروه در3 تکرار تقسیم بندی شدند که در گروه تیمار و کنترل به ترتیب با جیره غذایی حاوی 5 گرم به ازاء کیلوگرم ارگوسان و خوراک فاقد ارگوسان به مدت 50 روز تغذیه شدند. در روز 45 و50 نمونه برداری از موکوس پوست ماهی ها انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ارگوسان افزایش معنی داری درفعالیت آنزیم های مختلف مثل لیزوزیم ،پروتئاز ،آلکالین فسفاتاز و استراز را در روزهای45 و 50 موجب گردید. موکوس پوست در ماهی های تغذیه شده با ارگوسان باعث آگلوتیناسیون اریتروسیتها شد در حالیکه درگروه کنترل هیچ آگلوتیناسیونی مشاهده نشد. بعلاوه موکوس پوست در گروه تغذیه شده با ارگوسان خاصیت آنتی باکتریایی قوی در مقابل یرسینیا راکری داشت.

در نتیجه، اجزاء مهم ایمنی در موکوس پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان، که در سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی نقش دارند، با تجویز5 گرم به ازاء کیلوگرم ارگوسان تقویت گردیدند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات ---------- ۱

۱-۱- مقدمه ---------- ۲

۱-۲- سازکار عمل مواد محرک ایمنی ---------- ٤

۱-۳- رژیم های درمانی استفاده از مواد محرک ایمنی ---------- ٤

۱-٤- زمان استفاده از محرک های ایمنی ---------- ٥

۱-٥- روش های استفاده از مواد محرک ایمنی ---------- ٥

۱-٦- دز محرک های ایمنی ---------- ٦

۱-۷- سیستم ایمنی در ماهی ها ---------- ۷

۱-۱-۷-ایمنی غیر اختصاصی سرمی---------- ۷

۲-۱-۷- ایمنی غیر اختصاصی موکوسی ---------- ۸

۳-۱-۷- لیزوزیم ---------- ۹

۳-۱-۷-۱-اعمال بیولوژیک لیزوزیم در ماهی ---------- ۱۰

٤- ۱-۷- مهارکننده‌های آنزیمی ---------- ۱۱

٥-۱-۷-پروتئین فاز حاد ---------- ۱۱

٦-۱-۷- لکتین ها ---------- ۱۲

٦-۱-۷-۱-لکتین های موکوس جلدی ---------- ۱۲

٦-۱-۷-۲-لکتین های سرمی ---------- ۱۳

۷-۱-۷- سیستم عامل مکمل در ماهیان ---------- ۱۳

۸-۱-۷- تریپسین ---------- ۱۳

۹-۱-۷- سیتوکین ها ---------- ۱٤

۱۰-۱-۷- ایکوزانوئید ها ---------- ۱٤

۱۱-۱-۷- آگلوتینین ها و پرسیپتین ها---------- ۱٥

۱۲-۱-۷- کیتیناز و کیتینو بیاز --- ---------- ۱۵
۱۳-۱-۷- پروتئین های متصل به یون فلزات ---------- ۱٦
۱٤-۱-۷- آلفا پرسی پپتین---------- ۱٦
۱۵-۱-۷- همولیزین ---------- ۱٦
۱٦-۱-۷-پروتئیناز ---------- ۱۷
۱۷-۱-۷-آلفا ماکرو گلبولین ($\alpha_2 M$) -----------۱۷
۱-۸- بررسی اثر مواد محرک ایمنی بر ایمنی مخاطی ماهی ---------- ۱۸
۱-۹-پیشینه مطالعات صورت گرفته در مورد ارگوسان ---------- ۱۸
فصل دوم: مواد و روش کار ---------- **۲۱**
۲-۱- مواد ---------- ۲۲
۲-۱-۱- مواد مصرفی ---------- ۲۲
۲-۱-۲- مواد غیر مصرفی---------- ۲۳
۲-۲- روش کار---------- ۲٤
۲-۲-۱- ماهی ---------- ۲٤
۲-۲-۲- شرایط کیفی آب---------- ۲٤
۲-۲-۳- طراحی آزمایشگاهی ---------- ۲۵
۲-۲-٤- نحوه جمع آوری موکوس ماهی و آماده سازی آن برای آزمایشات ---------- ۲٦
۲-۲-۵- آزمایشات آنزیمی بر روی نمونه موکوس ---------- ۲٦
۲-۲-۵-۱- بررسی میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم ---------- ۲٦
۲-۲-۵-۲- بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ---------- ۲۷
۲-۲-۵-۳- بررسی میزان فعالیت آنزیم استراز ---------- ۲۸
۲-۲-۵-٤-اندازه گیری میزان فعالیت هماگلوتیناسیون ---------- ۲۸
۲-۲-۵-۵- اندازه گیری میزان فعالیت پروتئازی عصاره مخاطی ---------- ۲۸
۲-۲-۵-٦- بررسی خاصیت آنتی میکروبی موکوس---------- ۲۹
۲-۲-٦- روش آماری ---------- ۳۰
فصل سوم: نتایج ---------- **۳۱**
۳-۱- نتیجه ---------- ۳۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری---------- **۳٦**
٤-۱- بحث و نتیجه گیری---------- ۳۷

منابع ---------- **٤۱---**
ضمائم ---------- - **---٤٥**
اندازه گیری میزان توتال پروتئین(بردفورد،۱۹۷٦) ----------**-** ٤٦
نحوه تهیه محلول سوسیانسیون گلبول قرمز ۲/٥٪ طیور ---------- ٤۷

جدول شماره ۱ ---------- ۲٤
جدول شماره ۲ ---------- ۲٥
جدول شماره ۳ ---------- ۳۳
نمودار شماره ۱ ---------- ۳٤

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

هر ساله در سرتاسر جهان گونه‌های جدید ماهی‌های آب شیرین و شور پرورش داده می‌شوند. میزان تولید نیز با توجه به رشد جمعیت در جهان در حال افزایش می‌باشد. بنابراین تلاش بر افزایش تراکم ماهی در واحد حجم آب می‌باشد که این افزایش تراکم بطور زیان‌باری سلامت ماهی را متاثر نموده است وسبب بروزاسترس درپرورش ماهی گردیده است. ازطرف دیگرورود انواع فاضلاب های صنعتی و بیمارستانی در محیط آبی محل پرورش ماهی‌ها سبب تشدید استرس و تضعیف سیستم ایمنی ماهی می‌گردد. هر ساله مقادیر زیادی از مواد شیمیایی به منظور درمان بیماری‌های ماهی مورد استفاده قرار میگیرد که مشکل افزایش مقاومت باکتری‌های بیماری‌زای ماهی را به همراه داشته است. علاوه بر آن موجب بروز مشکلات بهداشت انسانی وزیست محیطی می‌شود. واکسیناسیون یکی از راه‌های پیشگیری در برابر بیماری‌های عفونی ماهی‌ها می‌باشد بطوری که تاکنون چندین نوع واکسن توسط پرورش دهندگان ماهی مورد استفاده قرار گرفته است اما این واکسن‌ها علیه تعداد بسیار محدودی از عوامل بیماری‌زا بوده و کنترل همه بیماریهای ماهی از طریق واکسن امری دشوار است.

مواد محرک ایمنی[1] از طریق تقویت سیستم دفاع غیراختصاصی و حتی اختصاصی قادر به مقابله با بیماری‌های عفونی می‌باشد و از آن جائی که ماهی برخلاف پستانداران بیشتر به سیستم ایمنی غیراختصاصی متکی است بنابراین استفاده از مواد محرک ایمنی به عنوان یک مکمل غذایی قادر به بهبود دفاع غیراختصاصی و ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا در زمان بروز استرس‌های فراوان حین دوره‌پرورش می‌باشد. تحقیقات در

[1] -Immnuostimulant

زمینه یافتن مواد محرک ایمنی مناسب در ماهی در حال افزایش است و هم اکنون نیز تعداد زیادی از ترکیبات مختلف در صنعت آبزی پروری به عنوان مواد محرک ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرند.(شیخ زاده، ۱۳۸۷).

مواد محرک ایمنی به هفت گروه تقسیم‌بندی می‌شوند:

۱- ترکیبات صناعی مانند نیسین[۲] و لوامیزول

۲- مشتقات باکتریائی و قارچی مانند لوان[۳]، ارگوسان[٤] و گلوکان

۳- ویتامین‌ها مانند ویتامین E و C و کمپلکس‌های ویتامینی مانند Salar-bec

٤- هورمون‌ها مانند هورمون رشد و پرولاکتین

۵- ترکیبات حیوانی مانند عصاره بدست آمده از غلافداران[۵] دریائی، بره موم[٦] وعصاره حرارتی از نوعی اسکوئید[۷]

٦- پروبیوتیک‌ها مانند باکتری‌ها اسید لاکتیکی، پربیوتیک‌ها که مواد غیرقابل هضم ولی تسهیل کننده رشد میکروارگانیسم‌های مفید هستند مانند اینولین وسین بیوتیکها[۸] که مرکب از پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها هستند.

۷- ترکیبات گیاهی

---

[2] -Nisin
[3] -Levan
[4] -Ergosan
[5] -Tunicata
[6] -Propolis
[7] -Ecteinascida turbinate
[8] -Synbiotics

در سال‌های اخیر، به دلیل توجه به حفظ محیط زیست و استفاده از مواد فاقد باقیماندگی در محیط زیست استفاده از مواد محرک ایمنی گیاهی در حال افزایش می‌باشد. (شیخ زاده، ۱۳۸۷).

۱-۲- سازوکار عمل مواد محرک ایمنی

به طور کلی مواد محرک ایمنی نقش تحریک کنندگی و نیز تنظیم سیستم ایمنی داشته و به علاوه به صورت بالقوه نقش ایمنی‌زایی دارند. این مواد را می‌توان همراه واکسن‌ها(مانند توکسین باکتری‌ها، نمک‌های آلومینیومی، پلی نوکلئوتیدها) قبل از واکسن‌ها، بعد از تجویز واکسن، مانند گلوکان‌ها و یا به تنهایی استفاده کرد. برخی از این مواد مانند گلوکان‌ها نقش تحریک ایمنی دارند و در صورتی که پس از تجویز واکسن‌ها استفاده شوند، نقش تحریک ایمنی داشته و چنانچه قبل از تجویز واکسن‌ها استفاده شوند، موجب تحمل ایمنی خواهند شد. برخی از این مواد مانند لوامیزول و سولفات دکستران را می‌توان قبل از تجویز واکسن‌ها یا به تنهایی استفاده کرد. نحوه عمل مواد محرک ایمنی یا از راه آنتی ژن(واکسن) و یا از راه میزبان است. (سلطانی، ۱۳۸۷).

۱-۳- رژیم‌های درمانی استفاده از محرک‌های ایمنی

استفاده از محرک‌های ایمنی می‌تواند سبب محافظت و ایجاد مقاومت در برابر تعدادی از بیماری‌های عفونی ماهیان شود، با این وجود ماهی درمقابل کلیه عفونت‌هاو بیماری‌های عفونی، توسط محرک‌های ایمنی محافظت نمی‌شود. ماهیان دریافت کننده موادمحرک ایمنی افزایش مقاومت در برابر عفونت‌های ویبریوآنگلوئیلارم،

ویبریوسالمونیسیدا وگونه‌های استرپتوکوکوس رانشان می‌دهند. همچنین بیماری‌های ویروسی مانند کله زرد و همچنین عفونت‌های انگلی، مثل بیماری لکه سفید با محرک‌های ایمنی تا حدی قابل کنترل‌اند. اثرمثبت محرک‌های ایمنی دربرابربسیاری ازعفونت‌های ویروسی ودیگر عفونت‌های باکتریایی مانند عفونت‌های سایتوفاگایی نیز گزارش شده است. بیشتر محرک‌های ایمنی موجب افزایش مقاومت دربرابررنی باکتریوم سالمونینارم وپاستررولاپیسی سیدا و ادواردزیلاایکتالوری نمی‌شوند. این باکتری‌ها در مقابل قدرت فاگوسیتی سلول‌ها مقاوم بوده و قادر به زندگی و ادامه حیات در داخل ماکروفاژها می‌باشند. همانگونه که قبل از این ذکر شده محرک‌های ایمنی با افزایش عملکرد فعالیت ماکروفاژها در افزایش ایمنی دخالت کرده، بنابراین باکتری‌های مقاوم در برابر فاگوسیتوز با خاصیت کشندگی ماکروفاژها می‌توانند در امان بوده و محرک‌های ایمنی در جلوگیری از بروز این بیماری‌ها اثر چندانی ندارند. (سلطانی، ۱۳۸۷).

۱-٤- زمان استفاده از محرک‌های ایمنی

زمان به کارگیری موادمحرک ایمنی نیزنکته بسیار مهمی می باشد. به صورت معمول بهترین زمان استفاده از آنتی بیوتیک ها بعد ازشیوع بیماری است. تاتلفات مربوط به بیماری کاهش یابدولی مواد محرک ایمنی به طور معمول قبل از بروز بیماری ها استفاده می شوند. به دلیل خطر ایجادمقاومت باکتریائی استفاده ازآنتی بیوتیک به منظورپیشگیری منطقی نمی باشد اما در مقایسه با مواد محرک ایمنی در سطح متوسط بوده ودر مقایسه با واکسن هادرحد بالایی می باشد وطول دوره ماندگاری اثر آنتی بیوتیک و مواد محرک ایمنی کوتاه بوده و در موردواکسن این دوره طولانی تر است.(Sakai, 1999)).

۱-۵- روش‌های استفاده از مواد محرک ایمنی

بسیاری از پژوهشگران تزریق محرک‌های ایمنی در ماهیان راروش موثردرایجاد ایمنی در مقابل عوامل بیماریزا دانسته‌اند، ولی این روش بسیاردشوار و وقتگیرودر مورد ماهیان با وزن زیر ۱۵ گرم، غیر ممکن است. در نتیجه ازروش‌های دیگرمانندمصرف خوراکی و غوطه‌ورسازی مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده خوراکی ازمحرک‌های ایمنی درمورد گلوکانها، لاکتوفرین، لوامیزول و کیتوزان باموفقیت انجام شده است. این روش عاری ازهر گونه استرس بوده وبه سایزماهی نیز بستگی ندارد. مصرف خوراکی این نوع محرک‌های ایمنی در افزایش عملکرد لوکوسیت‌ها وایجاد ایمنی در برابر بیماری‌هایی مثل فرونکولوز، ویبریوز، استرپتوکوکوزیس موثر بوده است. کپورهای غوطه‌ورسازی شده درمحلول لوامیزول (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۲٤ ساعت) موجب افزایش فعالیت‌های فاگوسیتوزی در لوکوسیت‌های کلیه قدامی می‌شود و این اثر حداقل ۲ هفته باقی می‌ماند. همچنین قزل‌آلای غوطه ور شده در محلول گلوکان با کیتوزان، افزایش مقاومت در برابر بیماری فرونکولوز نشان می‌دهد. (سلطانی، ۱۳۸۷).

۱-٦- دز محرک‌های ایمنی

اگرچه محرک‌های ایمنی سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماریزا می‌شوند، اما تعیین دز مناسب آن‌ها بسیار مهم می‌باشد. برای مثال اثرات افزایش انفجار تنفسی فاگوسیت‌ها در قزل‌آلای رنگین کمان با تزریق ۰/۵-۰/۱ (میلی گرم وزن بدن) لوامیزول مشاهده می‌شود، ولی تزریق ۵ میلی گرم لوامیزول به ازای

هر میلی لیتر آب، این اثرات را ایجاد نمی‌کند. همچنین خاصیت انفجار تنفسی با تجویز $۰/۱-۱ mg/ml$ گلوکان به صورت غوطه وری به حداکثر می‌رسد، ولی در دز $۱۰ mg/ml$ فاقد اثر بوده و دز $۵۰ mg/ml$ خاصیت سرکوب ایمنی دارد. در مورد ماده FK156 نیز دوزهای بالای ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر فاقد اثرات تحریک ایمنی است، ولی دزهای پایین‌تر موجب تحریک سیستم ایمنی می‌شود. (علیشاهی ، ۱۳۸۸).

۱-۷- سیستم ایمنی در ماهی‌ها

ایمنی ساز وکار مهم فیزیولوژیکی حیوانات برای محافظت در مقابل عفونتها و تامین تعادل و هموستاز داخلی است. ایمنی ممکن است به صورت غیر اختصاصی (ساز و کار دفاع ذاتی میزبان در مقابل عفونتها)بوده و یا اکتسابی (فرآیند اختصاصی در پاسخ به عوامل خارجی خاص)باشد. ایمنی اکتسابی شامل پاسخ ایمنی هومورال یا مایعی(تولید ایمونوگلوبولین)وسلولی(پس زدن پیوند و ازدیاد حساسیت تاخیری)است. ماهی به علت قرارگیری در رده های پایین تکامل جانوری بیشتر وابسته به ایمنی غیر اختصاصی(ذاتی یا طبیعی)است. به طور کلی دستگاه ایمنی ماهی تکامل کمی یافته و اطلاعات در مورد آن محدود است. هنگام مواجهه با اجرام بیماریزا، ایمنی غیر اختصاصی وظیفه محافظت اولیه ماهی و رهایی از جرم بیماریزا را بعهده دارد. ایمنی غیر اختصاصی خودش به دو بخش کلی تقسیم بندی می شود: ایمنی غیر اختصاصی سرمی و ایمنی غیر اختصاصی موکوسی. (علیشاهی ، ۱۳۸۸).

۱-۱-۷-ایمنی غیر اختصاصی سرمی

سرم،مخاط و تخم ماهی حاوی مواد مختلفی هستند که به صورت غیر اختصاصی باعث ممانعت رشد میکرو ارگانیسمهای بیماری زا می شوند. این مواد اغلب پروتئین یا گلیکوپروتئین هستند. سرم طبیعی حیوانات شامل انواعی از مولکولها است که در برابر آنتی ژنهای مختلف واکنش می دهند وبه علاوه این اجزا (از جمله پادتن ها)در خصوصیات زیست شناسی و فیزیکوشیمیایی خود تنوع شکلی دارند. این اجزای هومورال ایمنی طبیعی شامل پروتئینهای فازحاد، لیزوزیم، کمپلمان، لیزین، آگلوتینین، لکتین، تریپسین، سیتوکین، پرسیپتین، پروتئینهای متصل شونده به یونهای فلزی، ایکوزانوییدها و.... می باشند. (علیشاهی ، ۱۳۸۸).

۲-۱-۷-ایمنی غیر اختصاصی موکوسی

سد بافتهای پوششی به عنوان اولین خط دفاعی در برابر عوامل مهاجم می باشد. سالم بودن ویکنواختی پوشش اپیتلیالی عامل مهمی در دفاع ایمنی و نیز حفظ تعادل اسمزی مایعات داخلی بدن ماهی است. اپیتلیال طبیعی توسط لایه مخاطی که با سلول های گلابی شکل ترشح می شود، پوشیده شده است. لایه موکوسی لایه ای بین بدن ماهی و محیط خارجی را تشکیل می دهد. مهمترین عمل مخاط ممانعت از چسبیدن باکتری، قارچ و انگلها به سطوح پوششی است. لایه مخاطی به طور دائمی توسط سلولهای ترشح کننده موکوس بازسازی می شود. میزان ترشح موکوس ممکن است در پاسخ به عفونت یا محرکهای فیزیکی و شیمیایی افزایش یابد. وجود عوامل ضد میکروبی مثل لیزوزیم و باکتریولیزین در موکوس پوست ماهی گزارش شده است. کمپلمان نیز به عنوان یکی از سیستمهای ضد میکروبی مهم در مخاط پوست مورد توجه است. (علیشاهی، ۱۳۸۸).

به برخی اجزای مهم ایمنی غیر اختصاصی چه موکوسی وچه سرمی در ماهی در زیر اشاره شده است:

۳-۱-۷- لیزوزیم

لیزوزیم که توسط گلبول‌های سفید منتشر در بافت‌های مختلف و گردش خون ترشح می‌شود، در ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال و دستگاه گوارش و سرم خون ماهیان یافت می‌شود و قادر به شکستن پیوندهای گلیکوزیدی لایه پپتید و گلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت است. در واقع لیزوزیم که یک پلی پپتید ۱۲۰ اسید آمینه‌ای در ماهیان است، موجب هیدرولیز زنجیرهای بتای ۱ تا ٤ ان استیل مورامیک اسید[9] می‌شود. این ترکیبات در دیواره سلولی بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و منفی وجود دارند و بخشی از موکوپپتیدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت‌اند که در نتیجه هیدرولیز آنها دیواره سلولی باکتری‌ها سوراخ و باکتری‌ها منهدم می‌شوند. همچنین لیزوزیم موجب هیدرولیز ترکیبات گلی کوکیتینی[10] می‌شود، اما روی کیتین [11] اثر کمتری دارد. قابل ذکر است که این ترکیبات کیتینی در دیواره سلولی قارچ ها و اسکلت خارجی بی مهرگان وجود دارد. لیزوزیم توسط نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها و به مقدار کمتری توسط ماکروفاژها تولید می‌شود. این آنزیم باعث افزایش بیگانه خواری توسط سلول های بیگانه خوار به صورت مستقیم و غیرمستقیم می گردد. فعالیت مطلوب لیزوزیم ماهیان در pH ٥/٥ تا ۷/٥ است و در pH با دامنه ٤/۸ تا ۹/۲ نیز فعالیت آنها ذکر شده است. البته اختلافاتی در pH مطلوب برای فعالیت آن در بین ماهیان آب شیرین و دریایی وجود دارد. از نظر مقایسه لیزوزیم در بعضی بافت‌های ماهیان میزان آن در کلیه ماهی آزاد بیشتر از قزل آلا بوده و غلظت آن در آزاد ماهیان بیشتر از ماهی روغن است و در موکوس گربه‌ماهی، کپور و

---

[9] β(1-4)N-acetyl muramic و 2-acetylamino-2-deoxy-D-glucose

[10] -Glycochitin

[11] Chitin

مارماهی ژاپنی مقدارش بالاست. عوامل موثر در میزان لیزوزیم ماهی عبارتند از ۱- فصل؛ ۲- مرحله بلوغ جنسی؛ ۳- جنس ماهی؛ ٤- درجه حرارت محیط؛ ٥- تحریک آنتی ژنی که موجب افزایش آن می‌شود؛ ٦- گونه ماهی؛ ۷- استرس که موجب کاهش میزان آن می‌شود؛ ۸- مصرف مواد محرک ایمنی مانند گلوکانها و لوامیزول. (سلطانی، ۱۳۸۷).

۱-۳-۱-۷- اعمال بیولوژیک لیزوزیم در ماهی

در ماهیان لیزوزیم اغلب در بافت‌های غنی از لکوسیت‌ها مانند قسمت قدامی کلیه و بافت‌های پوست، آبشش و دستگاه گوارش یافت می‌شود و اتفاقا این محل‌ها در ماهیان بیشتر از سایر مناطق مورد تهاجم باکتری‌ها واقع می‌شوند. همچنین لیزوزیم در تخم ماهیان به میزان قابل توجهی وجود دارد. بنابراین با توجه به خاصیت ضد میکروبی این آنزیم و حضور آن در این گونه بافت ها، می‌توان گفت که لیزوزیم نقش مهمی برای مواجهه با عوامل بیماری‌زای عفونی برای ماهیان ایفا می‌کند. مطالعات اخیر که بر روی گونه‌های مختلف ماهیان پرورشی و وحشی انجام شده نیز، بیانگر این واقعیت است که این آنزیم یکی از عوامل دفاعی/ ایمنی مهم برای ماهیان به شمار می‌رود. همانطوری که اشاره شد منشاء تولید این آنزیم در ماهیان نیز مانند پستانداران لکوسیت‌ها (مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها) است. لیزوزیم بر اساس انچه در منابع آمده باید خصوصیات زیر را دارا باشد: ۱- آنزیمی است که سلول میکروکوکوس لیزودیکتیکوس را هضم می نماید. ۲ –توسط سلولز پوشیده شده با کیتین جذب میگردد. ۳ –در حالتهای اسیدی و دماهای بالا پایدار بوده و در شرایط قلیایی غیرفعال میگردد. ٤ – پروتئینی با وزن مولکولی پایین می باشد. (علیشاهی، ۱۳۸۸).

٤-١-٧- مهارکننده‌های آنزیمی[12]

شامل مهارکننده‌هایی مانند آنتی پروتئیناز و آنتی تریپسیناز می‌باشد که عملشان خنثی‌سازی فعالیت آنزیم‌های خارجی عوامل بیماریزا مهار کننده‌های پروتییناز مانند α_2 – ماکروگلوبولین (α_2–Macroglobulin) که دامنه وسیعی از پروتییناز‌ها را مهار می‌کنند، در سرم ماهی وجود دارند. عملکرد مهار کننده‌های پروتئیناز حفظ هموستاز خون و دیگر مایعات بدن و تنظیم فعالیت سازوکارهایی مانند واکنش زنجیره عامل مکمل و انعقاد خون است. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها و انگل‌ها هم برای تسهیل در نفوذشان و هم به منظور به دست آوردن غذا بافت‌های میزبان را مورد هضم خارج سلولی قرار می‌دهند مهارکننده‌های پروتئیناز می‌توانند برای خنثی‌سازی بعضی از این فعالیت‌ها به مصرف برسند. (سلطانی، ۱۳۸۷).

٥-١-٧- پروتیین فاز حاد[13]

پروتیین فاز حاد (CRP) یکی از اجزای معمولی سرم است که بعد از قرار گرفتن در معرض عواملی چون آندوتوکسین باکتریایی مقدارش به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

CRP می‌تواند به عنوان یک اپسونین (Opsonin) عمل کند و احتمالا فاگوسیت‌ها را به تنهایی و یا از راه فعال‌سازی سیستم عامل مکمل افزایش دهد. در قزل‌آلای رنگین کمان CRP در لنفوسیت‌های محیطی و بخش

[12] -Enzyme inhibitors
[13] -C-reactive protein= CRP