

معرفی پروتئین‌های سرم خون، خالص سازی و تعیین وزن مولکولی ایمونوگلوبولین (IgM) ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور

احمد غرقی*^۱، علیرضا رضوانی گیل‌کلایی^۲

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۳۳-۱۵۷۴۵

۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۷۹/۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۶

چکیده

در این مقاله پژوهشی مقادیر و خصوصیات پروتئینها و ایمونوگلوبولینهای ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور در شرایط فیزیولوژیک طبیعی آب و هوایی ایران مورد بررسی قرار گرفته است. مجموع مقادیر ایمونوگلوبولین‌ها (IG) در پستانداران، مانند موش و انسان، به طور معمول بین ۱۵-۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در حدود ۲۵ درصد کل پروتئین‌های سرم خون را تشکیل می‌دهند. در این پژوهش مشخص گردید. در حالیکه ماهیان استخوانی تنوع ایمونوگلوبولین‌های پستانداران را ندارند ولی غلظت IgM در کل پروتئین‌های سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور پرورشی در کشور بالاتر از مقادیر ایمونوگلوبولین‌ها (IG) پستانداران است. همچنین مشخص گردید غلظت پروتئین تام سرم خون ماهیان آرای رنگین‌کمان و آمور پرورشی در کشورمان به طور کلی پایین تر از غلظت پروتئین تام در سرم خون پستانداران است. بررسی مطالعات و پژوهش‌های سایرین و همچنین اندازه‌گیری خود ما نشان می‌دهد که هیچ پاسخی به این اختلاف وجود ندارد. جداسازی و خالص‌سازی ایمونوگلوبولین سرم (IG) ماهی با استفاده از روش تولید آنتی‌بادی سرم ماهی در خرگوش و تصفیه آنتی‌بادی با روش دیالیز و استفاده از تجزیه و تحلیل ایمونوالکتروفورزیس و کروماتوگرافی میل ترکیبی، مشخص شد. وزن مولکولی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین ماهی قزل‌آلا ۸۲ و زنجیره‌های سبک متمایز آن حدود ۲۱ کیلو دالتون و وزن مولکولی زنجیره سنگین و سبک IgM برای ماهی آمور به ترتیب ۷۰,۴ و ۲۵,۳ کیلو دالتون تعیین گردید.

کلمات کلیدی: پروتئین سرم، خالص سازی، وزن مولکولی ایمونوگلوبولین (IgM)، قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور.

مقدمه

امروزه حدود ۲۱۷۰۰ گونه ماهی زنده وجود دارد. این تعداد برابر نیمی از گونه مهره‌داران شناخته شده می‌باشد. از این تعداد ماهی تقریباً ۲۱۰۰۰ گونه ماهی استخوانی و ۷۰۰ گونه ماهی الاسموبرانش^۱ (کوسه‌ها و سفره ماهیان) می‌باشد و از گروه اخیر (۱۲۰ گونه) هلولوسفالها^۲، ماهی شمرئید^۳، برایکوپتریگینها^۴، هلوستینها^۵، ماهیان غضروفی استخوانی (ماهیان خاویاری و شبه خاویاری^۶)، ماهیان دو دمی (شش‌دار)، سلوکانتها^۷ و مارماهیان دهان گرد مانند میکسینیدها^۸ یا پترومیزونیدها^۹ (لامپری) می‌باشند (Avtalion, 1969).

بررسی خصوصیات پروتئینهای سرم خون ماهیان در تعداد محدودی از ماهیان مطالعه گردیده است. پروتئینهای سرم خون ماهیان با سایر مهره‌داران متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال ماهیان فاقد بعضی از گلوبولینها به خصوص آنهایی که به عنوان ایمنوگلوبولینهای مهره‌داران عالی به شمار می‌روند هستند. مطالعات محققین نشان می‌دهد که ایمنوگلوبولینها در ماهیان همگی جزء ماکروگلوبولینها هستند و مشابه IgM انسان می‌باشد (Dunier et al., 1993; Dunier and Siwicki, 1993; Fange, 1993; Fontenot, 198). ایمنوگلوبولینها (پادتنها) اساساً توسط پلاسموسیتها تولید می‌توند که از سلولهای B مشتق شده‌اند، ماهیان استخوانی فرایندهای ایمنی بسیار پیشرفته‌ای را نشان

می‌دهند همین امر نیز در الاسموبرانشها (کوسه‌ها، سفره ماهیان) دیده می‌شود (Avtalion, 1969). سیستم ایمنی در ماهیان دهان گرد (لامپری، مارماهی انگلی) بسیار کم توسعه یافته است. پلاسموسیتها که سلولهای ترشح کننده ایمنوگلوبولین در ماهیان می‌باشند از B لنفوسیتها مشتق می‌شوند و با روشهای میکروسکوپ الکترونی در بافتهای لنفومیلوئید همه گروههای اصلی مهره‌داران حتی در ماهیان دهان گرد مشخص شده‌اند با این وجود پادتنهای احتمالی به طور همه جانبه توسط پلاسموسیتها تولید نمی‌شوند بلکه سایر انواع گلوبولهای سفید ماهیان نیز آنها را می‌سازند (Avtalion, 1969). بررسی‌های ایمنوتوکسیکولوژی نشان می‌دهد که سیستم ایمنی ماهیان تحت تاثیر سموم محیطی تخریب می‌شوند و مطالعات خانم دکتر دونیر و دکتر سوویچی نیز حاکی از همین مسئله می‌باشد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۱؛ Jiang et al., 1991). بافت لنفومیلوئیدی اصلی پستانداران مغز استخوان، تیموس، طحال، گره‌های لنفوی بافتهای لنفوپیتال و بافت پیوندی می‌باشند. بررسی مشخصات و اندازه‌گیری پروتئینها و ایمنوگلوبولین سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان و آموور که از مهمترین ماهیان پرورشی سرد آبی و گرم آبی کشورمان می‌باشد، اطلاعات بسیار مهمی را در رابطه با وضعیت کیفی و کمی جیره غذایی آنان، روش غذادهی و همچنین بررسی وضعیت سیستم ایمنی آنان در شرایط فیزیولوژیکی و طبیعی بدست داد. ارزیابی پروتئینهای سرم خون این ماهیان و تعیین مقادیر ایمنوگلوبولین آنان در شرایط آب و هوای ایران از مهمترین اهداف این مطالعه و مقدمه‌ای جهت تحقیقات آینده برای اجرای واکسیناسیون ماهیان پرورشی در

1. Elasmobranches

2. Holocephalans

3. Chimaeroid

4. Brachiopterygians (bichirs)

5. Holosteans (bowfin, gars)

6. Paddle fish

7. Coelacanth (Latimeria)

8. Myxinids (hag fishes)

9. Petromyzonids (lampreys)

دانشستن نیازمندیهای غذایی ماهیان بر روی ماهیان قزل‌آلا و آزاد انجام شده است. مقادیر اسید آمینه‌های ضروری که می‌بایستی در جیره روزانه شش گونه ماهی به قرار زیر موجود باشد در جدول ۱ آمده است (Fuda *et al.*, 1991).

ایران محسوب می‌گردد. عوامل مختلفی می‌تواند مقدار پروتئین‌های سرم ماهیان را تحت تاثیر قرار بدهد. از مهمترین این عوامل بیماریهای عفونی، واکسیناسیون و کمیت و کیفیت جیره غذایی ماهیان و درجه حرارت آب استخرهای پرورش می‌باشد. بیشترین کوششها برای

جدول ۱: نیازمندیهای شش گونه ماهی به اسید آمینه‌های ضروری (درصد)

اسید آمینه ضروری	قزل‌آلای رنگین کمان	چینوک سالمون	مارماهی (جوان)	کپور (چینی)	کوهو سالمون	گره ماهی
آرژنین	۲/۵	۲/۴	۱/۷	۱/۷	۲/۴	۲/۶
ایزولوسین	۰/۹	۰/۹	۱/۵	۱	۲/۴	۲/۴
لوسین	۱/۶	۱/۶	۱/۷	۱/۵	۳/۲	۳/۲
لیزین	۲	۲	۲	۳/۵	۱/۵	۱/۲
ترونین	۰/۹	۰/۹	۱/۵	۲/۴	۱/۸	۱/۸
والین	۱/۳	۱/۳	۱/۵	۲/۳	۳/۳	۳/۳
متیونین	۱/۵(a)	۱/۵(a)	۲/۱(a)	۱/۲(c)	۱/۵(a)	۲/۱(a)
فنل آلانین	۲/۱ (b)	۱/۲ (b)	۲ (b)	۴ (b)	-	۴/۶
تریپتوفان	۰/۲	۰/۲	۰/۴	۱	۰/۲	۰/۵
هیستیدین	۰/۷	۰/۷	۰/۸	۱/۳	۰/۷	۱/۴

a: بیش از دو سوم متیونین ممکن است از سیستم تهیه گردد. b: بیش از یک پنجم فنیل آلانین ممکن است از تیروزین تهیه گردد.

c: متیونین + سیستم

اثر الکتروفورز گلوبولینها به اجزاء کوچکتري تقسیم می‌شوند که شامل آلفا یک، آلفا دو، بتا یک و بتا دو و گاما گلوبولین می‌باشد.

ایمنوگلوبولین ماهیان یک ماکروگلوبولین می‌باشد و شباهت بسیار زیادی به IgM انسانی دارد. مطالعات ایمنولوژیکی ماهیان پرورشی در کارگاههای تکثیر و پرورش ضرورت بسیار مهم می‌باشد و این مطالعات تاکنون در ایران انجام نشده است به عنوان مثال واکنشهای اتو ایمنی که بر علیه اسپرم ماهیان در هنگام تخمکشی و لقاح در ماهیان به وجود می‌آید می‌تواند باعث از بین رفتن اسپرمهای مولد نر گردد. محققین نشان داده‌اند که عمل آگلوتیناسیون اسپرم (SAF) در سرم ماهیان مولد ماده وجود دارد (Fuda *et al.*, 1992) که می‌تواند عامل بسیار مهمی در وقفه برنامه‌های تکثیر

در صورتی که جیره غذایی ماهیان فاقد اسید آمینه‌های فوق باشند اختلالات رشد در ماهیان به وجود خواهد آمد. به عنوان مثال کمبود تریپتوفان باعث بیماری اسکولیوزیس^۱ و لردوزیس^۲ در ماهی آزاد و قزل‌آلا می‌گردد (Fuda *et al.*, 1991; Dorson *et al.*, 1989) و افزایش مقدار آرژنین در جیره غذایی قزل‌آلا می‌تواند باعث افزایش چشمگیر رشد آنان شود (Dorson *et al.*, 1989).

پروتئینهای پلاسما شامل آلبومین، گلوبولینها و فیبرینوژن هستند، در حالیکه سرم حاوی فیبریوژن نمی‌باشد. در اندازه‌گیری‌های شیمیایی آلبومین و گلوبولینها به طور تام تعیین می‌شوند، در حالی که در

1. Scoliosis

2. Lordosis

و پرورش ماهیان محسوب گردد. عامل (SAF) یک Igm با ملکول تترامریک با وزن ملکولی ۷۶۰ کیلو دالتون است که قادر به واکنش با اسپرم سایر گونه‌های ماهیان استخوانی نیز می‌باشد (Fuda et al., 1992).

مواد و روشها

تعداد ۲۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از دو ناحیه متفاوت پرورش ماهیان سردآبی یکی در فیروزکوه و دیگری در کلاردشت در سنین بین ۱۶-۷ ماهگی نمونه‌برداری شدند (جدول ۲). هم‌زمان تعداد ۲۱۰ قطعه ماهی‌آمور از دو کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرم‌آبی در حومه ساری (سمسکنده) به نام

کارگاه نصر و دیگری در حومه بهشهر (امیرآباد) به نام کارگاه آقای حاج مبارکی در سنین بین ۱۲-۸ ماهگی نمونه‌برداری شدند (جدول ۳). ماهیان نمونه‌برداری شده تماماً سالم بودند و سابقه یا علائم بیماری در آنها دیده نمی‌شد. ابتدا آنها بیومتری کرده و با دقت یک گرم توزین نموده و ماهی را درون حوله مرطوب بصورت طاقباز درآورده بطوریکه شکم کمی خمیده (محدب) شده و از ورید دمی مقدار ۵ تا ۱۰ میلی لیتر خونگیری شده و سرم آنها جداسازی گردید. ماهیان با این روش خونگیری کاملاً سالم و زنده دراستخر آب رها گردیدند و هیچگونه تلفاتی دیده نگردید.

جدول ۲: زمان، سن و تعداد ماهیان قزل‌آلا نمونه‌برداری شده

زمان	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند	اردیبهشت	خرداد
سن (ماه)	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
تعداد	۱۰	۱۵	۲۸	۲۹	۲۹	۲۹	۳۹	۴۳

جدول ۳: زمان، سن و تعداد ماهیان آمور نمونه‌برداری شده

زمان	اسفند	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر
سن (ماه)	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
تعداد	۳۶	۳۶	۴۴	۴۵	۴۹

زمان شروع نمونه‌برداری برای ماهی‌آمور را در سن دو ماهگی پیش‌بینی گردیده بود، اما به واسطه رشد کم و پائین بودن وزن بدن آنها خونگیری و تهیه سرم به اندازه کافی مقدور نبود به ناچار زمان نمونه‌برداری را تا سن ۸ ماهگی که به وزن و رشد مناسبی جهت خونگیری و تهیه سرم رسیده بودند به تعویق افتاد. جداسازی و اندازه‌گیری و تعیین مقادیر پروتئینهای سرم ماهیان مورد آزمایش از روش الکتروفورزیس سرم

ماهی بر روی ژل آکاروز با استفاده از کیت هیدرژل پروتئین ساخت شرکت سیبا پرفرانس فرانسه و برای تعیین مقدار پروتئین تام سرم از دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی مدل ۷۰۴ استفاده و سپس با استفاده از روش رسوب با نمک (سولفات آمونیوم) ایمنوگلوبولینهای ماهیان تقریباً خالص‌سازی شدند و با به کارگیری روش الکتروفورزیس و ایمونو الکتروفورزیس محل دقیق الکتروفورتیکی آنان شناسایی گردید.

مدت ۴۸ ساعت با استفاده از بافر فسفات دیالیز کرده و در این مدت چند بار بافر را تعویض نمودیم محلول نهایی در داخل کیسه دیالیز که اکثراً شامل گاماگلوبولین ماهیان می‌باشد عاری از سولفات آمونیم خواهد بود. در این روش آلومین، آلفا و بتا گلوبولین‌ها با سولفات آمونیم ۵۰٪ رسوب نخواهند کرد و در روی رسوب باقی می‌مانند که دور ریخته خواهند شد. برای تأیید تشخیص ایمنوگلوبولین ماهی، محلول نهایی داخل کیسه دیالیز را روی ژل آکاروز الکتروفورز گردید و محل دقیق الکتروفورتیکی Ig ماهیان مورد آزمایش را مشخص نمودیم.



شکل ۱: باند پرننگ IgM خالص شده

تعیین وزن مولکولی توسط فیلتراسیون ژل کروماتوگرافی: خالص سازی و وزن مولکولی ایمنوگلوبولین ماهیان آمور و قزل آلا با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (ساخت کارخانه فارماسیای سوئد) با ستون حاوی Sephacryl S- ۳۰۰ در ابعاد ۱/۶ × ۵۷ سانتی متر تخت با حجم (V) ۱۱۴/۶ میلی لیتر شسته و تعیین شد.

نتایج

در این بررسی با روش الکتروفورز پروتئین‌های موجود در سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور را بر اساس شارژ الکتریکی آنها از یکدیگر جدا نموده و مقادیر آنها را با استفاده از دستگاه دانسیتومتر با فیلتر ۵۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس با رنگ آمیزی

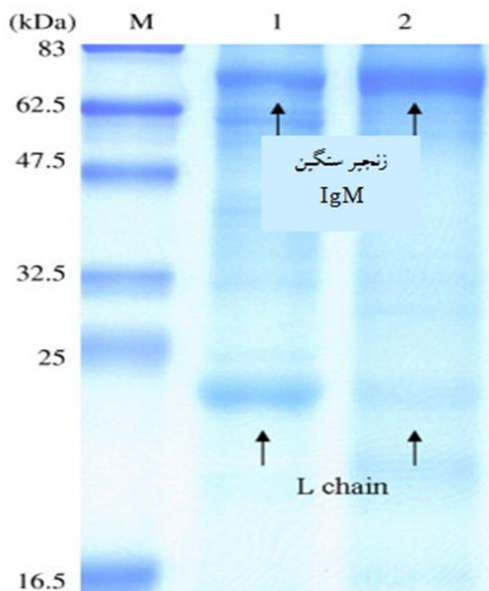
تهیه آنتی سرم پلی والان ضد سرم ماهی

برای تهیه آنتی سرم پلی والان ضد سرم ماهی از تزریق متوالی به دو خرگوش سفید آزمایشگاهی در انسیتو پاستور تهران استفاده گردید. هر خرگوش به میزان ۱/۵ و ۰/۵ میلی لیتر سرم خون ماهیان آمور و قزل‌آلا بطور جداگانه بصورت فاصله هفتگی داخل وریدی آنتی ژن (سرم ماهی) دریافت نمودند. در دوره استراحت برای چند هفته تزریق انجام نگردید. پس از تزریقات متوالی و دوره استراحت خونگیری جهت شناسایی آنتی بادی‌ها صورت گرفت. واکنش ایمنونودیفرن ژل با آنتی بادی (خرگوش) و آنتی ژن (سرم ماهی) روی لام موجب ایجاد رسوبات اختصاصی گردید که تولید آنتی بادی پلی والان ضد سرم ماهی تأیید گردید.

خالص سازی ایمنوگلوبولین ماهیان

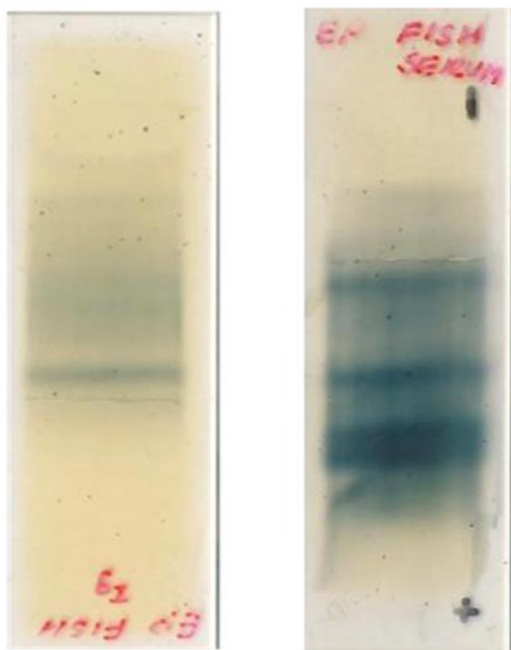
برای خالص نمودن ایمنوگلوبولین ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور از سولفات آمونیم ۵۰ درصد استفاده گردید. بدین طریق که به هم حجم سرم ماهی در حالی که در یک ظرف یخ قرار داشت، قطره قطره از محلول سولفات آمونیم اشباع شده و سرد ۴°C اضافه نموده مرتب هم زده و مجموعه را در ۱۰/۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار سانتریفوژ کرده، سپس مایع رویی رسوب را دور ریخته و رسوب حاصل را در بافر فسفات به حجم اولیه سرم حل نموده و مجدداً مطابق روش قبل با هم حجم آن سولفات آمونیم اشباع شده اضافه نمودیم تا رسوب شستشو گردد. پس از سانتریفوژ دوباره مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در بافر فسفات حل و برای خارج نمودن سولفات آمونیم، مجموعه را در کیسه‌های دیالیز به

نتایج حاصل از مطالعات الکتروفورتیکی نیز تأیید گردید.



وزن مولکولی پروتئین های سرم ماهی آمور
Ctenopharyngodon idella

شکل ۴: پروتئین های سرم ماهی آمور و IgM خالص شده



پروتئین های سرم ماهی قزل آلا و IgM خالص شده

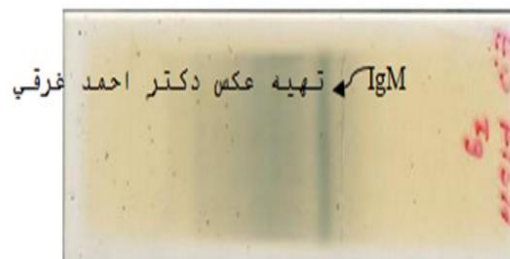
شکل ۵: پروتئین های سرم ماهی قزل آلا و IgM خالص شده

باندهای حاصل از مهاجرت پروتئین ها و پس از ترسیم منحنی های مربوط به هر یک از باندها توسط دستگاه دانسیتومتر با فیلتر زرد ۵۸۰ نانومتر، مقادیر کمی هر یک از اجزاء پروتئین های سرم ماهیان قزل آلا و رنگین کمان و آمور تعیین گردید.



شکل ۲: پروتئین های سرم خون ماهی قزل آلا و رنگین کمان

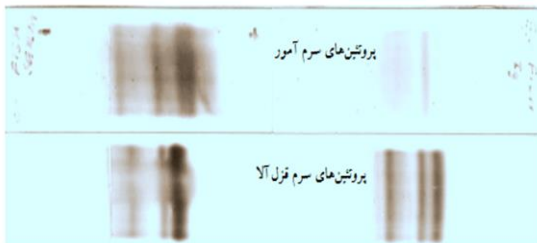
در این بررسی جهت تعیین مقادیر Ig ماهیان و تعیین محل دقیق الکتروفورتیکی آن ابتدا Ig ماهیان را با استفاده از آمونیوم سولفات تا حدودی خالص گردید و سپس ایمنوگلوبولین خالص شده را دوباره الکتروفورز گردید و با الکتروفورز سرم کامل ماهیان مقایسه به عمل آوردیم و مشخص گردید که Ig ماهیان بررسی شده در منطقه گاما و بتا قرار دارد لذا مجموع مقادیر مناطق بتا و گاما به عنوان مقدار Ig سرم ماهیان محاسبه و منظور گردید.



شکل ۳: IgM خالص شده ماهی قزل آلا و رنگین کمان

آزمایش های ایمنوفوریتیک با استفاده از آنتی بادی پلی والان ضد سرم ماهی در خرگوش انجام گردید و

که مورد آزمایش الکتروفورزیس قرار گرفتند را نشان می‌دهد.



شکل ۶: مقادیر پروتئین‌های سرم خون قزل آلا ی رنگین - کمان و آمور

میانگین گلوبولین آلفا یک در قزل آلا ۱۷/۳ میلی گرم و در ماهی آمور ۶/۵ میلی گرم در میلی لیتر و میانگین گلوبولین آلفا دو در سرم قزل آلا ۴/۴ میلی گرم و در ماهی آمور ۰/۴ گرم در میلی لیتر و میانگین IgM در قزل آلا ۴/۹۴ میلی گرم و در آمور ۳/۴۶ میلی گرم در میلی لیتر محاسبه گردید (جداول ۴ و ۵). شکل ۶ مقادیر پروتئین‌های دو نمونه سرم خون ماهیان قزل آلا و آمور

جدول ۴: میانگین مقادیر پروتئین‌های سرم خون ماهی قزل آلا ی رنگین کمان در سنین مختلف رشد

تعداد ماهی	۱۰	۱۵	۲۸	۲۹	۲۹	۲۹	۲۹	۴۳	جمع: ۲۲۲
زمان	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند	اردیبهشت	خرداد	میانگین
سن (ماه)	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۴	۱۶	کل
پروتئین	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
TP mg/ml	۳۹	۳۲/۳	۵۱	۳۷/۲	۳۵/۳	۳۸/۲	۳۷	۳۷/۴	۳۸/۵
ALB mg/ml	۱۲/۸	۱۱/۵	۱۶/۵	۱۱/۶	۱۰/۸	۱۰/۶	۱۰/۳	۱۱/۲	۱۲
$\alpha 1$ mg/ml	۱۸/۲	۸/۱	۲۴/۱	۱۸/۶	۱۶/۵	۱۸/۷	۱۷/۳	۱۶/۵	۱۷/۳
$\alpha 2$ mg/ml	$\frac{3}{4}$	۷/۵	۴/۴	۲/۷	۳/۷	۴/۵	۳/۷	۴/۱	۴/۴
IgM mg/ml	۳/۳	۵/۲	۵/۳	۵/۲	۴/۲	۴/۶	۶	۶	۴/۹۴

پروتئین تام سرم TP - آلبومین ALB - آلفا یک آلفا دو ، گلوبولین $\alpha 1$ $\alpha 2$ - گاما گلوبولین IgM

شکل ۵: میانگین مقادیر پروتئین‌های سرم خون ماهی آمور در سنین مختلف رشد

تعداد ماهی	۳۶	۳۶	۴۴	۴۵	۴۹	جمع: ۲۱۰
زمان	اسفند	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	میانگین
سن (ماه)	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	کل
پروتئین	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
TP mg/ml	۳۱/۶	۱۳/۷	۲۱/۶	۱۷/۶	۱۰/۲	۱۹
ALB mg/ml	۷/۸	۵/۱	۶/۳	۲/۴	۲/۹	۵
$\alpha 1$ mg/ml	۱۰/۶	$\frac{1}{4}$	۷/۱	۷/۷	۲/۸	۶/۵
$\alpha 2$ mg/ml	۱۰/۶	۲/۳	۴/۱	۲/۷	۲/۷	۴
IgM mg/ml	۵/۴	۱/۱	۴/۳	۴/۷	۱/۸	۳/۴۶

پروتئین تام سرم TP - آلبومین ALB - آلفا یک آلفا دو ، گلوبولین $\alpha 1$ $\alpha 2$ - گاما گلوبولین IgM

بحث

سیستم گردش خونی که مملو از سلولهای قرمز و سفید (اریتروسیتها و لکوسیتها) می باشد، از ویژگی های مشترک مهره داران به شمار می رود و احتمالا از مهره داران اولیه پرکامبرین به ارث رسیده است (Avtalion, 1969). خون و لنف نقش مهمی در ثابت نگه داشتن محیط داخلی بدن دارند. حجم خون در ماهیان بین ۸-۲ درصد متغیر است.

ترکیبات مواد غیر آلی پلاسمای ماهیان با آب دریا بسیار شباهت دارد اما غلظت یونی یک سوم تا یک چهارم غلظت مواد غیر آلی اقیانوس ها می باشد.

مارماهیان (میکین) در این موضوع استثنا می باشد چرا که خون آنها هم غلظت با آب دریا است. اوره نقش مهمی در تنظیم اسمزی مایعات بدن در الاسموبراشها (کوسه و سفره ماهیان) دارد. پروتئین های اصلی پلاسمای خون ماهیان گلبولینها هستند که قسمت اعظم آنتی بادی (ایمنو گلوبولینها) را تشکیل می دهد. سلولهای قرمز به طور طبیعی ۹۸ تا ۹۹ درصد سلولهای خونی را شامل می شوند. مقدار حجم خون در ماهیان استخوانی نسبت به سایر مهره داران کم می باشند و حدود ۵٪ وزن بدن را تشکیل می دهد.

مقدار غلظت پروتئین پلاسمای ماهیان کمتر از مقدار پروتئین پلاسمای انسانی و حدود ۷ گرم در لیتر می باشد و این فاکتور در گونه های مختلف ماهیان بین ۱/۶۸ تا ۶/۱۹ گرم در لیتر متغیر می باشد (Ghoroghi, 2009).

همچنین مقدار غلظت پروتئین در پلاسمای قزل آلا رنگین کمان سالم بین ۵۰-۳۰ میلی گرم در میلی لیتر گزارش شده است مقدار پروتئین در سرم

ماهیان نیز ۳۵ میلی گرم در میلی لیتر گزارش شده است (Itami et al., 1988).

لذا مقدار طبیعی پروتئین سرم در ماهیان قزل آلا بین ۷۰-۳۰ میلی گرم در میلی لیتر مورد توافق محققین می باشد.

مقدار ایمنو گلوبولین ماهیان در منابع معتبر بسیار متغیر گزارش شده است به عنوان مثال دکتر رونالد روبرنز در کتاب آسیب شناسی ماهیان مقدار ایمنو گلوبولین را در سرم ماهیان ۷-۲ میلی گرم در میلی لیتر بیان می دارد در حالی که دکتر سویچی از آزمایشگاه آسیب شناسی و ایمنولوژی انسیتو شیلات لهستان و دکتر داگلاس اندرسون از آزمایشگاه تحقیقات بهداشت آبیان در آمریکا، مقدار ایمنو گلوبولین در پلاسمای قزل آلا طبیعی و سالم را بین ۲۰-۱۰ میلی گرم در میلی لیتر گزارش نموده اند (Itami et al., 1988).

جدول ۶: مقدار طبیعی پروتئین تام و ایمنو گلوبولین در سرم و

پلاسمای ماهیان

مقدار پروتئین	پلاسمای ماهیان	مقدار پروتئین
۳۰-۵۰ میلی گرم در میلی لیتر (۱۳)	پلاسمای ماهیان	۳۵ میلی گرم در میلی لیتر (۱۱)
۱۰-۲۰ میلی گرم در میلی لیتر (۱۳)	پلاسمای ماهیان	۲-۷ میلی گرم در میلی لیتر (۱۲)
۲-۷ میلی گرم در میلی لیتر (۱۲)	سرم	۰/۰۰۲ میلی گرم در میلی لیتر (۱۲)
۲-۷ میلی گرم در میلی لیتر (۱۲)	سرم	
۳۰-۵۰ میلی گرم در میلی لیتر (۱۳)	پلاسمای ماهیان	

مقدار پروتئین تام سرم ماهیان آزمایش شده

شده

در بررسی های آزمایشگاهی و الکتروفوریزیکی این تحقیق نیز میانگین مقدار پروتئین سرم برای ماهی قزل آلا ۳۸/۵ میلی گرم در میلی لیتر و برای ماهی آمور ۱۹ میلی گرم در میلی لیتر محاسبه گردید. این مقدار پروتئین در سرم خون برای ماهی قزل آلا سالم در

جدول ۷: مقایسه مقدار آلومین و گلوبولین‌های ماهی و انسان

	درصد آلومین	درصد گلوبولین‌ها	نسبت آلومین به گلوبولین‌ها
آمور	۳۶	۷۴	۰/۴۹
قزل‌آلا	۳۰	۷۰	۰/۴۳
انسان	۷۰	۳۰	۲/۳

کاهش مقدار آلومین نسبت به گلوبولین در ماهیان علت ژنتیکی داشته و همانطوری که در مقدمه توضیح داده شده است این موضوع به علت نقص در سیستم دفع مواد نیتروژنی به شکل ترکیبات محلول آمونیاکی از طریق بافت آبشش به محیط آب می‌باشد که باعث کاهش آلومین در سرم خون می‌گردد.

این وضعیت جدا از خروج مواد نیتروژنی متابولیزه شده توسط کلیه (ادرار) و یا باقی مانده غذای هضم شده در لوله گوارش می‌باشد (Dorson et al., 1989). لذا پرورش دهندگان ماهی با دانستن وضعیت پروتئین سرم در شرایط مختلف رشد می‌توانند کمیت و کیفیت پروتئین جیره غذایی را تعیین و برنامه غذایی را به طریقه علمی تنظیم کنند و در صورت افزایش مقدار آمونیاک نسبت به تصفیه به موقع آب و یا افزایش جریان آب ورودی و یا خروجی استخرها اقدام کنند. این موضوع ضرورت میزان پروتئین بیشتر در جیره غذایی ماهیان پرورشی، تنظیم برنامه غذایی و تصفیه به موقع آب استخرها را توجیه و تاکید می‌کند.

همانطور که در منحنی الکتروفورزیس سرم ماهیان مشاهده می‌گردد آلومین سرم بسیار کمتر از مقدار آلفا یک می‌باشد. مقدار آلومین سرم خون برای ماهی قزل‌آلا ۱۲ میلی‌گرم و برای ماهی آمور ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

حداقل میزان طبیعی می‌باشد و در ماهی آمور بسیار پائین تر از میزان طبیعی است، هیپوپروتئینی ماهیان آمور بررسی شده علامت درمانگاهی بارز سوء تغذیه شدید آنها می‌باشد و احتمال بروز مرگ و میر ناشی از عوامل بیماریزا در آنها بسیار زیاد می‌باشد. نگارنده این نوع سوء تغذیه را ناشی از کمبود مقدار پروتئین جیره و نامنظم دادن غذا و احتمال درگیر بودن آنها با بیماری‌های انگلی مزمن می‌داند.

مقدار آلومین سرم ماهیان آزمایش شده

یکی از پروتئین‌هایی که بواسطه وزن مولکولی کم حرکت سریعی داشته و به طرف قطب مثبت مهاجرت نمود، آلومین سرم بود. مقدار این پروتئین نسبت به گلوبولین‌های سرم بسیار کم می‌باشد و این نسبت در دو گونه ماهیان سرد آبی و گرم آبی مورد آزمایش کاملاً مشهود می‌باشد و آزمایش‌های سرولوژیک ما نشان می‌دهد این وضعیت عکس نسبت آلومین به گلوبولین در پستانداران (انسان) می‌باشد.

داده‌های به دست آمده از دستگاه دانسیتومتر سیبا پرفرنس حاکی از آن است که مقدار متوسط آلومین در ماهی قزل‌آلا حدود ۳۰ درصد و در ماهی آمور حدود ۲۶ درصد پروتئین تام سرم می‌باشد و مابقی پروتئین آنان را گلوبولین‌ها تشکیل می‌دهند، این نسبت در مقایسه با انسان برعکس می‌باشد، در انسان مقدار آلومین ۸۰-۷۰ درصد و گلوبولین‌ها ۳۰-۲۰ درصد پروتئین تام سرم می‌باشد.

مقدار گلوبولینهای سرم ماهیان آزمایش

شده

گلوبولینها از ۴ جزء تشکیل شده‌اند. انواع گلوبولینهای سرم ماهیان نیز بر مبنای الکتروفورزیس سرم انسان نامگذاری و تقسیم‌بندی شده و به نامهای آلفا یک، آلفا دو، بتا و گاما مشخص گردیده‌اند.

مقدار گلوبولین آلفا یک در تمام نمونه‌های ماهی قزل‌آلا از ماهیان آمور آزمایش شده بیشتر می‌باشد و مطابق جداول ۴ و ۵ می‌باشد. در انسان گلوبولینهای آلفا یک، آلفا دو و بتا گلوبولین در کبد و گاما گلوبولین در سیستم رتیکولو آندوتیال ساخته می‌شود.

بتا گلوبولین ناقل فلزات در خون می‌باشد و به نام ترانسفرین نامیده می‌شود. فیبرینوژن نیز از پروتئین‌های محلول در پلاسما می‌باشد که هنگام تهیه سرم به صورت فیبرین از سرم جدا می‌گردد. و در الکتروفورز سرم دیده نمی‌شود. بخش مهمی از گلوبولینها، ایمنوگلوبولینها می‌باشند که خاصیت ایمن‌سازی دارند. ایمنوگلوبولین ماهیان مشابه IgM انسان می‌باشد و فاقد گروههای ایمنوگلوبولینهای پستانداران می‌باشند (غرقی، ۱۳۷۵؛ Dunier et al., 1993; Dunier and Siwicki, 1993; Fange, 1993)

ماهیان فاقد مغز استخوان و گره‌های لنفاوی هستند اما سایر اشکال بافت لنفومیلوئیدی را به خوبی دارا می‌باشند، نیموس یک مکان مهم تولید لنفوسیت در ماهیان جوان به شمار می‌آید که در هنگام بلوغ جنسی تحلیل رفته و یا ناپدید می‌شود. طحال ماهیان به عنوان صافی خون عمل می‌کند این عضو غنی از بافت لنفومیلوئیدی است اما مراکز زاینده ندارد (Avtalion, 1969). سلولهای تولیدکننده ایمنوگلوبولین (پلاسموسیتها) ممکن است در اغلب بافتهای

لندومیلوئید یافت شوند و احتمالاً در همه ماهیان لنفوسیتها از دیواره روده تراوش می‌شوند.

ایمنوگلوبولین ماهیان یک ماکروگلوبولین می‌باشد و شباهت بسیار زیادی به IgM انسانی دارد و مقدار آن در سرم خون ماهیان استخوانی ۷-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و غلظت آن در صفرا ۰/۰۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نیمه عمر IgM در خون ماهیان ۱۶-۱۲ روز گزارش شده است (Ghoroghi, 2009).

Roberts در سال ۱۹۸۹ در کتاب آسیب‌شناسی ماهی محل استقرار الکترونورتیکی IgM ماهیان استخوانی را در باندهای آلفا و بتا مشخص نموده‌اند، اما نتایجی را که ما از آزمایش خالص سازی IgM و الکتروفورز دوباره آن گرفتیم حاکی از این است که IgM ماهیان قزل‌آلای مورد آزمایش در شرایط آب و هوایی ایران در منطقه بتا و گاما قرار دارد.

آزمایش‌های ایمنو الکتروفورز انجام شده حاکیست که مقدار IgM ماهیان در طی دوران رشد افزایش نشان می‌دهند به طوری که حداکثر تولید IgM را در سن ۱۶-۱۴ ماهگی نشان می‌دهد. کاهش تدریجی مقدار ایمنوگلوبولین در سنین بین ۱۱-۱۲ ماهگی مربوط به کاهش دمای آب در ماههای بهمن و اسفند می‌باشند چون ماهیانی که در آبهای سرد و کمتر از ۷°C زندگی می‌کنند، ایمنوگلوبولین را تولید نمی‌کنند (غرقی، ۱۳۸۱؛ Fuda et al., 1991; Ghoroghi, 2009) و مقدار ایمنوگلوبولین سرم خون آنها کاهش می‌یابد ولی با گرم شدن آب و هوا و با شروع تغذیه مناسب مقدار آن به تدریج رو به افزایش می‌گذارد به طوری که در اواخر ماههای فروردین و اردیبهشت مقدار تولید ایمنوگلوبولین نسبت به ماههای سرد سال افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد و مقدار آن در اردیبهشت و

ایمنوگلوبین آنان هر قدر زمان می‌گذرد کاهش نشان می‌دهد.

مقدار کمیت و کیفیت جیره غذایی ماهیان قزل‌آلای مورد آزمایش تقریباً متناسب با حداقل نیازمندی‌های آنان بود و در شرایط مدیریتی بهتری قرار داشتند، چون مقدار میانگین پروتئین تام سرم آنان طبق نتایج آزمایشگاهی ما ۳۸/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برآورد گردیده است که با حداقل مقدار طبیعی این فاکتور که سایر محققین گزارش نموده‌اند برابر می‌باشد. اما میانگین پروتئین تام سرم ماهیان مورد آزمایش پائین‌تر از حداقل مقدار طبیعی و برابر ۱۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد.

مطابق نتایج آزمایش‌های سرولوژیک به دست آمده مقدار پروتئین تام سرم ماهیان هشت ماهه امور که از کیفیت خوبی نسبت به سایر سنین ماهی امور برخوردار بوده‌اند ۳۱/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (جدول ۴ و ۵) و مقدار آلبومین و گلوبولین‌های آن بیشتر از سایر سنین می‌باشد مربوط به کارگاه اول می‌باشد چون بچه ماهیان تغذیه دستی می‌شدند و در شرایط پرورشی مناسبی برای فروش قرار داشتند، ولی نتایج آزمایشگاهی به دست آمده از سرم ماهیان کارگاه دوم کاهش شدید پروتئین و سایر فراکسیونها مخصوصاً IgM را نشان می‌دهند و در آنها علائم درمانگاهی مانند پراکندگی و کاهش وزن دیده می‌شود. این نتایج به خوبی نشان می‌دهد که هر قدر وضعیت کمی و کیفی جیره غذایی ماهیان بالاتر باشد واکنش‌های بدن آنها نسبت به تغییرات محیط، عوامل انگلی و پاتوژن بهتر و مناسب‌تر می‌گردد و به عبارتی سلامتی ماهیان بهتر تأمین می‌گردد.

اواخر خرداد به ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزایش یافته است، ماهیان قزل‌آلا بواسطه اینکه در حوضچه‌های سیمانی کم عمق و آبهای شفاف و تمیز پرورش می‌یابند، در هنگام نمونه‌برداری با مشکلی مواجه نبودیم اما ماهیان امور در استخرهای خاکی وسیع چندین هکتاری به صورت پلی کالچر پرورش می‌یابند و درصد آنها در استخرهای پرورشی نسبت به سایر ماهیان دیگر مانند کپور معمولی و نقره‌ای و سرگنده کم می‌باشد (بین ۵-۸ درصد). لذا عملاً صید و نمونه‌برداری از آنها در استخرهای پرورشی ممکن نبود، به همین سبب حدود یک سوم از کل بچه امور ماهیانی که مورد بررسی قرار دادیم از کارگاههای تکثیر و پرورش کپور ماهیان در حوالی ساری (کارگاه نصر) و در هنگام تفکیک و فروش بچه ماهیان به متقاضیان پرورش ماهی می‌باشد، و دو سوم دیگر ماهیان موضوعیت در خصوص ماهیان امور مورد آزمایش کاملاً صدق نمی‌شکند و نوسانات مقدار IgM آنان، احتمالاً به واسطه سوء تغذیه در هنگام پرورش و نمونه‌برداری می‌باشد.

کاهش مقدار IgM در سرم ماهیان امور کاملاً ارزش درمانگاهی داشته و نشان می‌دهد که هر قدر مقدار پروتئین جیره کاهش یابد مقدار پروتئین کل سرم کاهش یافته و بالطبع مقدار IgM نیز کاهش نشان می‌دهد.

ماهیان قزل‌آلا بور از کارگاه پرورش ماهی حوالی بهشهر نمونه‌برداری شدند. در این کارگاه انواع بچه ماهیان در حداقل آب ممکنه و تقریباً بدون این که تغذیه گردند در یکی از استخرها جهت فروش به متقاضیان نگهداری می‌شدند به همین دلیل مقدار میانگین پروتئین تام سرم آنان و همین‌طور مقدار

تغییرات پروتئین‌های سرم از علائم مهم درمانگاهی می‌باشد کاهش آن می‌تواند نشانگر بیماری‌های عفونی مزمن و یا کاهش پروتئین جیره غذایی باشد و افزایش

آن حاکی از بیماری‌های عفونی حاد و یا نشانه ایمنی فعال در مرحله بعد از واکسیناسیون در آبزیان می‌باشد (Itami et al., 1988).

جدول ۸: میانگین پروتئین تام و فراکسیون‌های آن در سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان و آمور

نسبت آلبومین به گلوبولین	گلوبولین سرم mg/ml	آلبومین سرم mg/ml	پروتئین سرم mg/ml	
۰/۴۵	۲۶/۵	۱۲	۳۸/۵	قزل‌آلا
۰/۳۶	۱۴	۵	۱۹/۵	آمور
۱۳/۱	۲/۳	۳۰	۷۰	انسان

سایر نتایج آزمایشگاهی به دست آمده از الکتروفورز سرم خون ۲۲۰ قطعه قزل‌آلا و ۲۱۰ قطعه ماهی آمور نشانگر آن است که بیشترین پروتئین‌های سرم خون این ماهیان را گلوبولینها تشکیل می‌دهند و نسبت آلبومین به گلوبولین در ماهی قزل‌آلا ۴/۵ و برای ماهی آمور ۳/۶ می‌باشد.

سپاسگزاری

سپاس و امتنان از آقای دکتر سهراب رضوانی مشاور محترم رئیس موسسه تحقیقات علوم شیلاتی، آقای دکتر سید محمد حسین حسینی عضو هیئت علمی انسیتو پاستور، آقای دکتر فرشاد نقشوار رئیس بخش پاتوبیولوژی دانشگاه مازندران و دکتر احمدیان مسئول آزمایشگاه بیمارستان بوعلی سینای ساری مساعدت زیادی در انجام آزمایشها مبذول داشتند. همچنین آقای علیرضا فلاح کارشناس آزمایشگاه بیمارستان بوعلی سینای ساری و آقای ابراهیم بهساز کارشناس آزمایشگاه رفانس ساری، همکاری بسیار ارزشمندی در طول اجرای پروژه مبذول داشتند که بدین وسیله از آنان تشکر می‌کنیم.

منابع

۱. غرقعی، ا.، ۱۳۷۵. شناسایی و بررسی پروتئین‌های سرم خون ماهی اوزون‌برون *Acipenser stellatus* اولین کنگره جانورشناسی ایران.
۲. غرقعی، ا.، ۱۳۸۱. خالص سازی و تعیین نسبی وزن مولکولی پروتئین‌های سرم خون ماهی آمور *Ctenopharyngodon idella* مجموعه مقالات سومین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران.
۳. وثوقی، غ.ح.، مستجیر، ب.، ۱۳۷۱. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۱۷ صفحه.
4. Avtalion, R.R., 1969. Temperature effect on antibody Production and immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). *Immunology*. 17(6):927-31.
5. Dorson, M., Perrier, H., Perrier, C, Torchy, C., 1989. Antibodies in mucus and other secretions in fish. *Ichthyophysiology*. 13, 31-42.
6. Dunier, M., Siwicki, A.K., Scholtens, Y., Dal Molin, S., 1993. Influence of linden on nonspecific defense mechanisms and B – lymphocyte functions of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) presented at the international work shop and training course in Poland. Aug 23-Sep 3, 1993.
7. Dunier, M., Siwicki, A.K., 1993. Study of the effects of pollutant on fish defenses

- Development and Comparative Immunology. 16(5) 415-423.
12. Ghoroghi, A., 2009. Serological comparison of *Onchorhynchus mykiss* in various growth stage in Iran fish farming. Journal of Comparative Pathology, 141(4), 287-287.
 13. Itami, T., Takahashi, Y., Okamoto, T., Kubono, K., 1988. Purification and characterization of immunoglobulin in skin mucus and serum of ayu (*Plecoglossus altivelis*). Bulletin of Japanese Society for the Sciences of Fish. 54(9), 1611-1617.
 14. Jiang, Y., Li, Y., Yu, P., 1991. A preliminary study of immunorespense of grass carp. Hydrobiology. 2(4), 321-326.
 15. Roberts, R.J., 1989. Fish pathology. 4th Edition. Wiley-Blackwell. 590 p.
- mechanisms. Present at the international work shop and training course in Poland. Aug 23- Sep 3, 1993.
 8. Fange, R., 1993. Blood cells, Hemopoiesis and Lymphomyeloid tissues. The Nordic Symposium on Fish Immunology. Lysekil. 19-22 may.
 9. Fontenot, J., 1981. Nutrient Requirements of Coldwater Fish. National Academy Press, Washington, D.C.
 10. Fuda, H. Soyano, K., Yamasaki, F., Hara, A. 1991. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology. 99(4)637-643.
 11. Fuda, H., Hara, A., Yamasaki, F., Kobayashi, K.A., 1992. A Peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in egg of chum salmon (*Onchorhynchus keta*).