# مطالعه هموسیت‌های کل وپروتئین کل پلاسمای همولنف در سیستم ایمنی شاه‌میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*)

آرش سام نژاد [۱*]، محمد افشار نسب [۲]

۱. مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، ارومیه، ایران
۲. موسسه تحقیقات شیلات ایران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۵

**چکیده**

در مطالعه حاضر وجود هموسیت‌ها به عنوان سلول‌های دفاعی و پروتئین کل پلاسما در سیستم ایمنی شاه‌میگوی آب شیرین مورد بررسی قرار می‌گیرد. حدود ۱۰۰ قطعه شاه‌میگوی آب شیرین با میانگین وزنی ۲۵-۴۰ گرم از دریاچه مخزنی سد ارس واقع در استان آذربایجان غربی خریداری شده و به مرکز تحقیقات آرتمیای کشور واقع در شهرستان ارومیه انتقال یافتند. ۲۵ قطعه مازاد جهت تلفات احتمالی در نظر گرفته شد. قبل از انجام آزمایش شاه‌میگوها به مدت ۲ روز جهت آداپته شدن با شرایط محیطی جدید در آزمایشگاه نگهداری شده و سپس با آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین ضدعفونی و نهایتاً به تعداد مساوی (۱۵ قطعه شاه میگو به ازاء هر آکواریوم) در ۵ آکواریوم شیشه‌ای توزیع شدند. به‌منظور مطالعه هموسیت‌ها و پروتئین پلاسما، نمونه‌های همولنف از قطعه دوم شکمی شاه‌میگوها در فواصل زمانی (۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۲۴۰ و ۳۶۶ ساعت) اخذ گردید. براساس نتایج حاصل از این مطالعه میانگین میزان هموسیت‌ها در شاه‌میگوی آب شیرین بین $27\ CFU\ ml^{-1}$ -۱۱۴ و بیشترین و کمترین میزان هموسیت‌ها در ساعت ۱۲و۳۳۶ به میزان $180 CFU\ ml^{-1}$ و ۱۲ گزارش شد. همچنین براساس نتایج بدست آمده، سلول‌های نیمه‌دانه‌دار تقریباً ۵۸-۶۵ در صد، سلول‌های دانه‌دار ۲۸-۳۷ در صد و سلول‌های هیالین ۳-۶ درصد از سلول‌های هموسیت را در شاه‌میگوی آب شیرین تشکیل دادند. براساس نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری پروتئین کل پلاسما، میانگین میزان پروتئین کل در شاه‌میگوی آب شیرین بین ۱-۲ گرم در دسی‌لیتر و بیشترین و کمترین میزان پروتئین کل در ساعت ۱۲ و ۳۳۶ به میزان ۲/۸ و ۰/۵ گرم در دسی لیتر گزارش شد.

**واژگان کلیدی**: هموسیت، سلول‌های‌دانه‌دار، سلول‌های نیمه‌دانه‌دار، سلول‌های هیالین، پروتئین کل پلاسما

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: Drsam.arash@gmail.com

**۱. مقدمه**

شاه‌میگوی آب شیرین با نام علمی (*Astacus leptodactylus*) یکی از گونه‌های مهم خانواده کرای فیش‌ها یا خرچنگ‌های دراز آب شیرین می‌باشد که پرورش آن در بسیاری از کشورها با توجه به رشد سریع، هم‌آوری بالا، رژیم غذایی متنوع، قدرت سازگاری بالا نسبت به شرایط محیطی و مقاومت بالا نسبت به بیماری‌ها مورد توجه می‌باشد (Holdich et al., 1997). در ایران دریاچه مخزنی سد ارس به عنوان تنها زیستگاه طبیعی شاه‌میگوی آب شیرین می‌باشد که نقش مهمی را در صادرات این محصول ارزشمند به سایر کشورها دارد (Matinfar, 2007). شاه‌میگوی آب شیرین دارای سیستم گردش خون باز می‌باشد که به وسیله همولنف که از سلول‌های دفاعی هموسیت تشکیل یافته است اشباع شده است (Liu, 2008).

مطالعات نشان می‌دهد که هموسیت‌ها (سلول‌های خونی) در شاه‌میگوی آب شیرین هما نند سایر سخت‌پوستان نقش مهمی را در پاسخ‌های ایمنی میزبان ایفا می‌کنند (Jiravanichpasisal et al., 2006a).

این هموسیت‌ها از بافت هماتوپوئتیک منشا می‌گیرند و براساس اندازه و شکل سلول و میزان گرانول‌های داخل سیتوپلاسم معمولاً سه تیپ اصلی از هموسیت‌ها در بیشتر سخت‌پوستان ده پا مورد شناسایی قرار گرفته است که عبارتند از سلول‌های هیالین (HC) یا هیالین هموسیت‌ها (HH)، سلول‌های نیمه‌دانه‌دار (SGC) یا هموسیت‌های دانه‌دارکوچک (SGH) و سلول‌های دانه‌دار (GC) یا هموسیت‌های دانه‌دار بزرگ (LGH) (Soderhall and Smith, 1983; Gargion and Barracco, 1998; Johansson et al., 2000; Battison et al., 2003; Giulianini et al., 2007).

در شاه‌میگوها سلول‌های هیالین (HC) سلول‌های بیضی شکل و کوچک می‌باشند که معمولاً هیچ گرانولی در سیتوپلاسم خود ندارند یا چند عدد گرانول دارند و مسئول روند فاگوسیتوزیس می‌باشند. سلول‌های نیمه‌دانه‌دار (SGC) میزان مختلفی از گرانول‌های ائوزینوفیلیک کوچک را در سیتوپلاسم خود دارا می‌باشند و اساساً در روند این کپسوله شدن شرکت می‌کنند. سلول‌های دانه‌دار (GCs) دارای میزان زیادی از گرانول‌های ترشحی ائوزینوفیلیک در سیتوپلاسم خود می‌باشند و به عنوان سلول‌های ذخیره اصلی در فعالیت‌های سیستم پروفنل اکسیداز عمل می‌کنند (Johansson et al., 2000; Jiravanichpaisal et al., 2006a)

مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های نیمه‌دانه‌دار و دانه‌دار در پاسخ به نمونه‌های مولکولار مربوط به عوامل بیماری‌زا (PAMPs) ازجمله پپتیدوگلیکان‌ها و لیپوپلی ساکاریدهای (Lps) موجود در دیواره باکتری‌ها و بتا-۱و۳ گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ‌ها، دانه‌های خود را از دست داده و باعث آزاد سازی ترکیبات سیستم پروفنل اکسیداز آمین می‌شوند (Lin, 2010). سیستم پروفنل اکسیداز آمین از چند پروتئین مختلف تشکیل شده است که در سیستم دفاعی بی‌مهرگان در نتیجه تولید ملانین، چسبندگی سلولی، کپسوله شدن و روند فاگوسیتوز دخالت می‌کند (Gillespie et al., 1997; Soderhall and Cerenius, 1998; Sritunyalucksana and Soderhall, 2000).

مطالعات نشان می‌دهد که هموسیت‌ها و هپاتونکراس در سیستم ایمنی سخت‌پوستان بسیار مهم می‌باشند. بنابراین نقش اصلی را در تولید مولکول‌های تشخیص سیستم ایمنی و واکنش‌های هومورال بر عهده داشته و در واکنش‌های سلولار از طریق بعضی سلول‌های خاص و فاگوسیتوز شرکت می‌کنند (Gross et al., 2001). تحقیقات نشان می‌دهد که پروتئین کل پلاسما به‌عنوان یک نشانگر جهت بررسی وضعیت یا شرایط بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dele court et al., 1995; Dowson and Bortolotti, 1997; Schoech and Bowman, 2003).

میزان پروتئین کل سرم یک فاکتور متمایزکننده خوبی جهت ارزیابی وضعیت سلامتی در هر دو گروه آلوده و انتقالی می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که میزان پروتئین کل سرم در ماهیان منتقل شده به مزارع دیگر در مقایسه با ماهیان غیرانتقالی که دارای رژیم غذایی ثابت و یکسانی

می‌باشند؛ کاهش پیدا می‌کند. بعد از انتقال به تانک دیگر، ماهیان الگوهای رفتاری مختلفی را از خود نشان می‌دهند. ماهیان انتقال‌نیافته (جابجا نشده) به تانک‌های دیگر معمولاً دنبال غذا می‌روند ولی در ماهیان جابجا شده، این الگوی رفتاری در مدت زمان طولانی‌تری شکل می‌گیرد (Coeurdacier et al., 2011). تحقیقات نشان می‌دهد که اکسیژن و دی‌اکسیدکربن در محیط میزان پروتئین کل پلاسما یا پروتئین کل سرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند. البته میزان تغییرات جهت مقایسه خیلی ناچیز می‌باشد که احتمالاً به خاطر این است که اکسیژن و دی اکسیدکربن جزو فاکتورهای طبیعی محیط آبی می‌باشند و فقط در شرایطی خاصیت سمی برای ماهی ایجاد می‌کنند که میزان غلظت آن‌ها افزایش یابد (Coeurdacier et al., 2011).

بعضی مطالعات نشان می‌دهد که میزان پروتئین کل پلاسما با افزایش تراکم کاهش پیدا می‌کند. همچنین با جابجائی ماهی از یک تانک به تانک دیگر میزان پروتئین کل پلاسما برای سه هفته کاهش و سپس افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که انتقال، یک فاکتور استرس‌زای مهم برای ماهی می‌باشد که میزان پروتئین کل را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Coeurdacier et al., 2011).

اندازه‌گیری پروتئین کل یا پلاسمای کل به عنوان یک شاخص زیستی جهت بررسی استرس ناشی از تغییرات شوری در پلاسمای باس دهان گشاد (*Micropterus salmoides*) استفاده می‌شود (Riche, 2007). در تحقیق حاضر میزان هموسیت کل و پروتئین کل پلاسما و فراوانی انواع مختلف سلول‌های دفاعی هموسیت، در سیستم ایمنی شاه‌میگوی آب شیرین مورد مطالعه قرارمی‌گیرد.

## ۲. مواد و روش ها

برای انجام این مطالعه حدود ۱۰۰ قطعه شاه‌میگوی آب شیرین در مرحله بین پوست‌اندازی و با میانگین اندازه ۱۲ تا ۲۰ سانتی‌متر (در اواخر تابستان ۱۳۸۹) از دریاچه مخزنی سد ارس خریداری شده و با استفاده از یونولیت و همراه یخ به مرکز تحقیقات آرتمیای کشور واقع در شهرستان ارومیه انتقال یافت (۲۵ قطعه مازاد جهت تلفات احتمالی در نظر گرفته شد). قبل از انتقال شاه‌میگوها به داخل آکواریوم‌ها ابتدا شاه‌میگوها به‌مدت ۲ روز در داخل یکسری وان‌های بزرگ در آزمایشگاه مرکز تحقیقات آرتمیا نگهداری شده تا با شرایط محیط سازگار شده و تلفات احتمالی مشخص شود. سپس شاه‌میگوها با آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین با غلظت ppm۱۰۰ به‌مدت ۲۴ ساعت به خوبی ضدعفونی شده و به تعداد مساوی (۱۵ قطعه شاه‌میگو به ازاء هر آکواریوم) در ۵ آکواریوم شیشه‌ای توزیع شدند. در طول مدت زمان مطالعه شاه‌میگوها به فاصله یک روز در میان با کنسانتره ماهی‌قزل‌آلا، بیومار و کرم‌های خونی تغذیه می‌شدند و روزی یک‌بار درجه حرارت، pH و اکسیژن محلول آب اندازه‌گیری می‌شد که درجه‌حرارت آب ۱۰-۱۵ درجه سانتیگراد، pH ۸-۸/۵ ppm و اکسیژن محلول آب ۵-۵/۵ ppm بود. همچنین آب آکواریوم‌ها به فاصله یک‌روز در میان تعویض شده و املاح و فضولات و تلفات احتمالی شاه‌میگوها از داخل آکواریوم‌ها خارج می‌شد.

به منظور مطالعه هموسیت‌ها در شاه‌میگوها حدود ۰/۵ سی‌سی نمونه همولنف از سینوس دومین بند شکمی شاه‌میگوها (۱ قطعه شاه میگو به ازاء هر آکواریوم) در فواصل زمانی ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۲۴۰ و ۳۳۶ ساعت، با استفاده از سرنگ‌های استریل ۱ میلی‌لیتری با سرسوزن گیج ۴ استحصال کرده و با ۰/۵ سی‌سی ماده ضد انعقاد (Smith and Soderhall, 1983) جهت جلوگیری از انعقاد ترکیب گردید. ترکیبات تشکیل دهنده ماده ضدانعقاد: شامل؛ اسید سیتریک ۲۶ میلی‌مول، تری سدیم سیترات ۳۰ میلی‌مول، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱۰ میلی‌مول است و (pH=۵/۴)). سپس مخلوط نمونه همولنف و ماده ضد انعقاد را در دمای ۴ درجه سانتیگراد یخچال نگهداری کرده و تا فاصله زمانی مرحله بعدی نمونه برداری اقدام به شمارش هموسیت‌های کل و نوع سلول‌های هموسیت کرده و درصد فراوانی آنها یادداشت گردید. شاه میگوها بعد از انجام نمونه‌برداری به داخل یکسری وان‌های

بزرگ منتقل شدند. جهت شمارش هموسیت‌ها از لام هموسیتومتر استفاده گردید. به منظور شمارش هموسیت‌های کل و نوع سلول‌های هموسیت ابتدا یک قطره از مخلوط همولنف و ماده ضد انعقاد استحصال شده از شاه‌میگوها را به زیر لام هموسیتومتر انتقال داده و با استفاده از میکروسکوپ نوری اقدام به شمارش هموسیت‌ها در ۲۵ خانه وسط لام هموسیتومتر شد. به منظور محاسبه تعداد هموسیت‌ها در ۱ سی‌سی، تعداد هموسیت‌ها در ۲۵ خانه وسط لام هموسیتومتر، شمارش شده و ضربدر $۱۰^{۴}$ گردید. همچنین انواع مختلف سلول‌های دفاعی هموسیت براساس مطالعه Soderhall and Smith در سال (1983) شناسایی شده و درصد تقریبی آنها یادداشت گردید.

در تحقیق حاضر جهت اندازه‌گیری پروتئین کل همولنف در شاه‌میگوها از دستگاه اتوآنالایزور (مدل هیتاچی، محصول شرکت روچ آلمان) استفاده شد. روش کار به این شکل است که ابتدا ۰/۵ سی‌سی نمونه همولنف از شاه‌میگوهای نمونه برداری شده برای مطالعه هموسیت‌ها، در فواصل زمانی ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۲۴۰ و ۳۶۶ ساعت بعد از انتقال شاه‌میگوها به داخل آکواریوم‌ها، از سینوس دومین بند شکمی با استفاده از سرنگ‌های استریل۱ میلی‌لیتری با سرسوزن گیج ۴ اخذ شده و با ۰/۵ سی‌سی ماده ضد انعقاد (Smith and Soderhall, 1983) ترکیب گردید. در مرحله بعد مخلوط نمونه همولنف و ماده ضد انعقاد در داخل لوله‌های پلاستیکی درپوش‌دار ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور (rpm) ۲۹۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ حدود ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشته و در داخل یک سری فنجانک‌ها ریخته و روی فنجانک‌ها را براساس نمونه‌های اخذ شده از شاه‌میگوها را در فواصل زمانی خاص شماره‌گذاری کرده و در مرحله بعد نمونه‌ها را به دستگاه اتوآنالایزور انتقال داده و شماره‌ها را در دستگاه ثبت نموده و نهایتاً دستگاه در طول موج ۳۴۰-۸۰۰ نانومتر براساس جذب نوری میزان پروتئین کل همولنف را برای ما تعیین می‌کند.

در نهایت داده‌های بدست آمده از شمارش هموسیت‌ها و اندازه‌گیری پروتئین کل پلاسما از طریق آزمون‌های آنالیز آمار توصیفی در محیط نرم افزار Spss ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

## ۳. نتایج

براساس داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری میزان هموسیت کل همولنف در شاه‌میگوی آب شیرین، میانگین میزان هموسیت‌ها در شاه‌میگوی آب شیرین $۱۱۴-۲۷ \text{ CFU ml}^{-1}$ گزارش گردید و بیشترین و کمترین میزان هموسیت‌ها به ترتیب در ساعت ۱۲ و ۳۳۶ به میزان $۱۸۰\text{CFU ml}^{-1}$ و ۱۲ گزارش شد (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین ±انحراف معیار ، کمینه و بیشینه میزان هموسیت‌ها در ساعات مختلف مطالعه در شاه‌میگوی آب شیرین

| زمان(ساعت) | میانگین± انحراف‌معیار | کمینه | بیشینه |
|---|---|---|---|
| ۰ | ۴۸/۲۰±۲۰/۴۹ | ۲۰ | ۷۶ |
| ۶ | ۸۶/۶۰±۲۴/۱۲ | ۴۹ | ۱۱۰ |
| ۱۲ | ۱۱۳/۶۰±۵۷/۲۶ | ۴۴ | ۱۸۰ |
| ۲۴ | ۴۵ ±۱۹/۵۸ | ۲۱ | ۶۸ |
| ۴۸ | ۷۳/۲۰±۰/۹ | ۳۸ | ۹۲ |
| ۹۶ | ۳۳/۶۰±۲۰/۵۳ | ۳۶ | ۱۱۰ |
| ۱۴۴ | ۲۹/۸۰±۹/۷۳ | ۱۴ | ۶۱ |
| ۲۴۰ | ۸۵/۲۰±۲۴/۴۳ | ۵۸ | ۱۱۲ |
| ۳۳۶ | ۲۷ ±۱۲/۰۸ | ۱۲ | ۴۱ |

براساس یافته‌های بدست آمده از انواع سلول‌های هموسیت در شاه‌میگوی آب شیرین، سلول‌های نیمه‌دانه‌دار (SGC)، دانه‌دار (GC) و سلول‌های هیالین (HC)، به ترتیب بیشترین و کمترین نوع سلول‌ها را در شاه‌میگو تشکیل دادند. سلول‌های دانه‌دار(گرانولوسیت‌ها) بیشتر به اشکال بیضوی و کروی شکل دیده شدند. این سلول‌ها دارای در صد بیشتری از دانه‌ها (گرانول‌ها ) در سیتوپلاسم خود بوده و تقریباً بین ۲۸-۳۷ در صد از سلول‌های هموسیت را در شاه‌میگو

تشکیل می‌دادند، سلول‌های نیمه‌دانه‌دار (سمی‌گرانولوسیت‌ها) به اشکال مختلف کروی، گرد و بیضوی دیده شدند، این سلول‌ها نسبت به سلول‌های دانه‌دار دارای مقادیر کمتری از دانه‌ها (گرانول‌ها) در سیتوپلاسم خود بوده و تقریباً بین ۵۸-۶۵ درصد از سلول‌های هموسیت را در شاه‌میگو تشکیل دادند. سلول‌های هیالین(هیالونوسیت‌ها) نیز بیشتر به شکل بیضوی و گرد دیده شدند، براساس مشاهدات هیچ گرانولی در سیتوپلاسم این سلول‌ها مشاهده نشد و این سلول‌ها تقریباً ۳ تا ۶ درصد میزان سلول‌های هموسیت در شاه‌میگو را تشکیل دادند.

براساس داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری میزان پروتئین کل همولنف در شاه‌میگوی آب شیرین تقریباً میانگین میزان پروتئین کل در شاه‌میگوی آب شیرین بین ۱-۲ گرم در دسی‌لیتر و بیشترین و کمترین میزان پروتئین کل در ساعت ۱۲ و ۳۳۶ به میزان ۲/۸ و ۰/۵ گرم در دسی‌لیتر گزارش شد (جدول ۳).

جدول ۲ : در صد فراوانی سلول‌های هموسیت در ساعات مختلف مطالعه در شاه‌میگوی آب شیرین

| زمان(ساعت) | سلول‌های نیمه‌دانه‌دار | سلول‌های دانه‌دار | سلول‌های هیالین |
|---|---|---|---|
| ۰ | ۶۳/۰۷ | ۳۲/۷۸ | ۴/۱۵ |
| ۶ | ۶۲/۱۲ | ۳۳/۰۲ | ۴/۸۵ |
| ۱۲ | ۶۴/۲۶ | ۳۱/۸۶ | ۳/۸۷ |
| ۲۴ | ۶۴/۲۶ | ۳۶/۴۴ | ۴/۸۹ |
| ۴۸ | ۶۵/۳۰ | ۲۸/۹۶ | ۵/۷۴ |
| ۹۶ | ۶۳/۰۹ | ۳۲/۱۴ | ۴/۷۶ |
| ۱۴۴ | ۶۲/۴۱ | ۳۲/۲۱ | ۵/۳۷ |
| ۲۴۰ | ۵۸/۹۲ | ۳۶/۱۵ | ۴/۹۳ |
| ۳۳۶ | ۶۲/۹۶ | ۳۲/۵۹ | ۴/۴۴ |

## ۴. بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر میزان هموسیت‌های کل همولنف در شاه میگوی آب شیرین یک روند نزولی – صعودی را نشان می‌دهد به‌طوری که در طول ساعات مختلف مطالعه نوسانات میزان هموسیت‌ها دیده می‌شود.

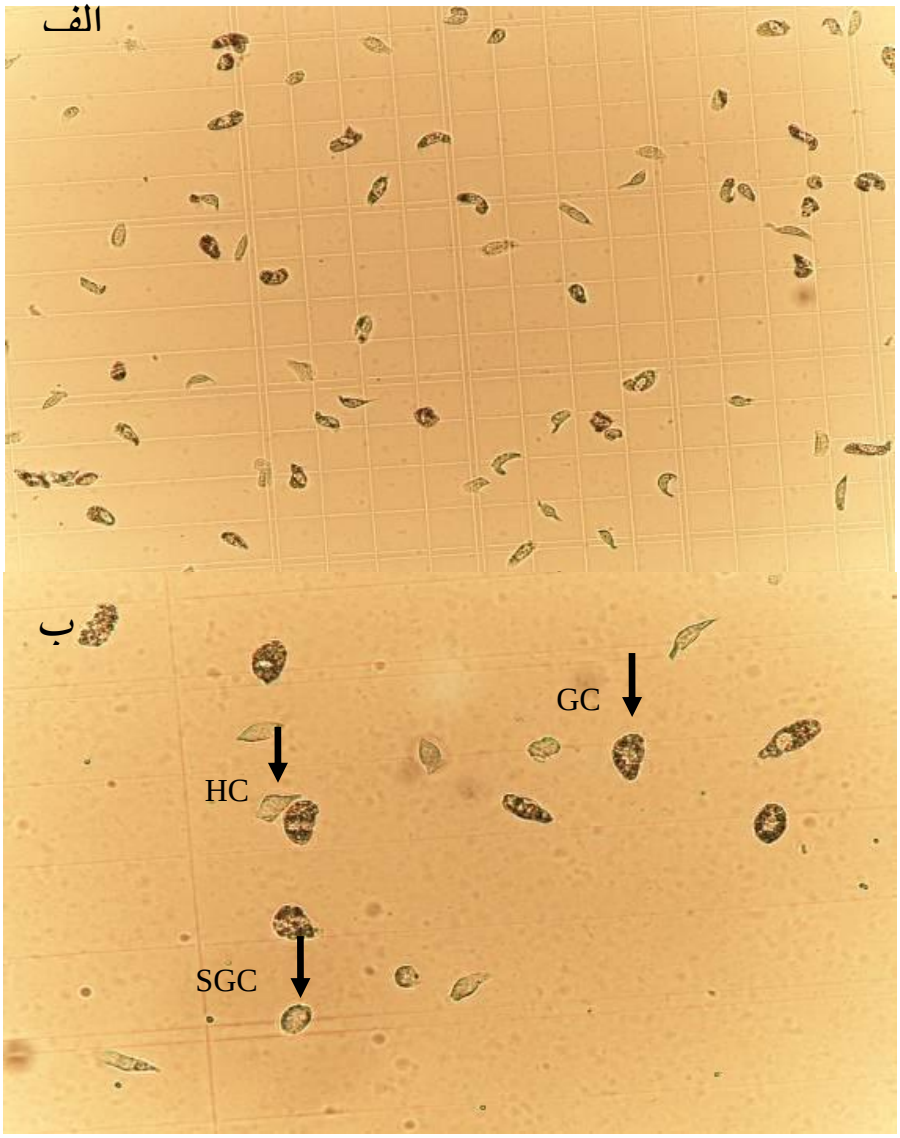
جدول ۳ : میانگین ± انحراف معیار، کمینه و بیشینه میزان پروتئین کل در ساعات مختلف مطالعه در شاه میگوی آب شیرین

| زمان(ساعت) | میانگین± انحراف معیار | کمینه | بیشینه |
|---|---|---|---|
| ۰ | ۱/۱۶ ±۰/۴۳ | ۰/۶ | ۱/۷ |
| ۶ | ۱/۹۶ ±۰/۵۳ | ۱/۴ | ۲/۶ |
| ۱۲ | ۱/۷۶ ±۰/۷۶ | ۰/۷ | ۲/۸ |
| ۲۴ | ۱/۴۶ ±۰/۵۳ | ۰/۷ | ۲/۱ |
| ۴۸ | ۱/۳۶ ±۰/۴۶ | ۰/۹ | ۲ |
| ۹۶ | ۱/۴۲ ±۰/۷۲ | ۰/۷ | ۲/۲ |
| ۱۴۴ | ۱/۶۴ ±۰/۶۲ | ۱/۱ | ۲/۵ |
| ۲۴۰ | ۱/۳۶ ±۰/۷۴ | ۰/۶ | ۲/۲ |
| ۳۳۶ | ۱ ±۰/۳۵ | ۰/۵ | ۱/۵ |

به نظر می‌رسد میزان هموسیت‌ها در شاه‌میگوی آب شیرین با توجه به محدوده دمایی مناسب آب آکواریوم‌ها (۱۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد) با گذشت زمان متغیر بوده و دستخوش تغییرات محیط قرار می‌گیرد ولی این دامنه تغییرات ( CFU $ml^{-1}$-۲۷-۱۱۴) احتمالاً ناشی از تغییرات سیستم بدنی و هورمونی شاه‌میگوها می‌باشد و یک حالت طبیعی را دارد. تحقیقات نشان می‌دهد که درجه حرارت ۱۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد، درجه حرارت مناسب جهت پرورش شاه‌میگوی آب شیرین می‌باشد. به‌طور کلی تلفات پایین، تغذیه مناسب و تحرک مناسب شاه‌میگوها در آب آکواریوم حاکی از این مطلب است. همچنین به‌نظر می‌رسد در این محدوده دمایی، سلول‌های دفاعی هموسیت چندان دستخوش تغییر قرارنمی‌گیرند (سام کوکیائی، ۱۳۹۰). در تحقیق حاضر به‌نظر می‌رسد میانگین میزان هموسیت‌های کل همولنف (۱۱۴-۲۷CFU $ml^{-1}$) در شاه‌میگوی آب شیرین یک روند طبیعی را دارد.

مطالعات نشان می‌دهد که میزان هموسیت‌های کل همولنف در شاه‌میگوی آب شیرین ناشی از غلظت بالای باکتری

آئروموناس هیدروفیلا، با توجه به استرس تحمیل شده به شاه‌میگوها در ساعات اولیه بعد از آلودگی اختلاف معنی‌داری را نسبت به غلظت‌های پایین آلودگی و گروه‌های مواجهه نشده با باکتری نشان می‌دهد (Samcookiyaei et al., 2012). همچنین در تحقیق دیگر انجام شده بوسیله مهاجری و همکاران در میگوی ببری‌سبز (*penaus semisulcatus*) ناشی از بیماری‌زایی باکتری ویبریو هاروئی، تغییرات معنی‌دار میزان هموسیت‌های کل همولنف با گذشت زمان در گروه‌های تحت تاثیر قرار گرفته با باکتری در مقایسه با گروه کنترل دیده می‌شود (Mohajare et al., 2011)




شکل۱. اشکال هموسیت‌های جدا شده از همولنف شاه میگوی آب شیرین- الف: اشکال مختلف هموسیت‌ها (بزرگنمائی،۲۲۰ (عدسی چشمی× عدسی شیئی)- ب: سلول دانه‌دار (GC) ، سلول نیمه دانه‌دار (SGC) و سلول هیالین (HC) (بزرگنمائی ۴۴۰)

در تحقیق حاضر با توجه به عدم مواجهه شاه‌میگوها با عوامل بیماری‌زا (باکتریایی، قارچی، انگلی و غیره) و عدم

استرس تحمیل شده به شاه‌میگوها ناشی از تاثیرات افزایش دما (Samcookiyaei et al., 2012)، تغییرات هموسیت‌ها در طول مدت زمان مطالعه طبیعی به نظر می‌رسد.

برخلاف مهره‌داران که سیستم ایمنی ترکیبی از پاسخ‌های دفاعی داخلی و سازگار شده می‌باشد ولی در بی‌مهره‌گان سیستم ایمنی تنها وابسته به چندین واکنش دفاعی داخلی در مقابله با عفونت‌ها می‌باشد. این واکنش‌ها شامل محافظت بوسیله موانع فیزیکی همراه با پاسخ‌های ایمنی سیستمیک و موضعی می‌باشند. دو تا از ترکیبات اصلی سیستم دفاعی در بی‌مهره‌گان، سیستم ایمنی سلولار و همورال می‌باشد که در پاسخ‌های ایمنی داخلی سیستمیک شرکت داشته و هر دوی این سیستم‌ها در مکانیسم ایمنی دخالت دارند. مطالعات نشان می‌دهد که شاه‌میگوی آب شیرین از طریق چندین پاسخ ایمنی سلولی و همورال شامل ملانیزه شدن، انعقاد خون، تولید پپتیدهای ضد میکروبی و فاگوسیتوز و کپسوله کردن میکروارگانیسم‌های مهاجم بوسیله هموسیت‌ها باعث افزایش پاسخ ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شود (Liu, 2008). در سخت‌پوستان دو گروه اصلی از هموسیت‌ها شامل سلول‌های دانه‌دار و بدون دانه شناسایی شده‌اند (Hose et al., 1990). در خانواده کرای فیش‌ها (خرچنگ‌های دراز آب شیرین ) سه تیپ اصلی از هموسیت‌ها شناسایی شده‌اند که شامل سلول‌های دانه‌دار، بدون دانه و سلول‌های هیالین می‌باشند که سلول‌های هیالین کمترین نوع سلول‌ها را تشکیل می‌دهند (Soderhall and Smith, 1983).

براساس مطالعات انجام گرفته بوسیله کاکولکی و همکاران، سلول‌های نیمه‌دانه، دانه‌دار و سلول‌های هیالین در میگوی ببری سبز به ترتیب بیشترین و کمترین نوع سلول‌ها را تشکیل می‌دهند (Kakolaki et al., 2010). که نتایج مطالعه انجام شده به وسیله کاکولکی و همکاران با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه حاضر سلول‌های نیمه‌دانه‌دار( ۵۸ -۶۵ ٪) سلول‌های دانه‌دار (۲۸-۳۷ ٪) و سلول‌های هیالین (۳-۶ ٪) به ترتیب بیشترین و کمترین نوع سلول‌ها را در شاه‌میگوی آب شیرین تشکیل دادند.

مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های هیالین به‌دنبال عوامل بیماری‌زای میکروبی و مرگ سلول‌ها در نتیجه از بین رفتن فعالیت فاگوسیتوز تولید می‌شوند (Soderhall et al., 1985). در مطالعه حاضر با توجه به عدم مواجهه شاه‌میگوها با شرایط استرس‌زا و عوامل بیماری‌زا، میزان سلول‌های هیالین طبیعی به نظر می‌رسد. شمارش هموسیت‌ها امکان دارد نشانه‌ای از تاثیرات عوامل فیزیکی تحت حاد در سخت‌پوستان باشد (Smith, 1991) و تغییر در شمارش هموسیت‌ها می‌تواند نشانه تاثیر عوامل استرس‌زا در بعضی گونه‌ها باشد (Lorenzon et al., 2001). همچنین شمارش هموسیت‌ها شاید به عنوان یک ابزار مناسب برای حفظ حالت‌های سلامتی گونه‌های سخت‌پوستان باشد (Mix and Sparks, 1980; Jussila et al., 1997). تحقیقات نشان می‌دهد که هموسیت‌ها نقش مهمی را در سیستم دفاعی سخت‌پوستان بر عهده دارند. اولاً آن‌ها ذرات خارجی را در محوطه همولنف از طریق فاگوسیتوز، کپسوله کردن و تجمعات گرانولی از بین می‌برند ثانیاً در روند ترمیم زخم از طریق تجمعات سلولی شرکت کرده و شروع به پروسه انعقاد از طریق آزادسازی فاکتورهای مورد نیاز برای لیز کردن پلاسما می‌کنند (Kakolaki et al., 2010).

به طور کلی با توجه به نقش مهم سلول‌های هموسیت در سازگاری و ایجاد تعادل شاه میگوها با تغییرات محیطی، عوامل استرس‌زا و بیماری‌زا، هر گونه تغییر در میزان هموسیت‌های کل و نوع سلول‌های هموسیت می‌تواند ناشی از عوامل استرس‌زا (افزایش تراکم، درجه‌حرارت، اکسیژن، تغذیه نامناسب و غیره) و عواملی بیماری‌زا (باکتریایی، قارچی، انگلی و غیره) باشد یا این تغییرات احتمالاً به‌دلیل این است که شاه‌میگوها خود را با تغییرات خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب و هرگونه تغییر در سیستم بدنی و هورمونی سازگار کنند. بعضی مطالعات نشان می‌دهد که تعداد هموسیت‌های کل و پروتئین کل پلاسمای به دلیل بیماری‌های سخت‌پوستان یک حالت نوسانی را نشان می‌دهد (Rodrigues and lemoullac, 2000).

پروتئین کل سرم یک پارامتر غیر مخرب و مناسب می‌باشد که یک روش اندازه‌گیری ارزان بوده و به‌آسانی و در هر مکانی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. افزایش منظم میزان پروتئین کل سرم به عنوان یک ابزار مناسب برای مشاهده وضعیت سلامتی ماهیان استفاده می‌شود (Coeurdacier et al., 2011). مطالعات نشان می‌دهد که تفاوت در غلظت پلاسمای کل یا پروتئین کل سرم به عنوان یک اندیکاتور کلینیکی مهم جهت ارزیابی وضعیت سلامتی، استرس و رفاه ارگانیسم‌های آبی و خشکی می‌باشد (Riche, 2007). بنابراین اندازه‌گیری غلظت پروتئین خون در گروه‌های ساده سخت‌پوستان می‌تواند اطلاعات با ارزشی را به‌منظور تعیین شرایط بدنی آن‌ها فراهم کند (Ozbay and Riley, 2002). در مطالعه حاضر مقدار و میانگین پروتئین کل پلاسمای همولنف در شاه‌میگوها یک روند نزولی - صعودی را نشان می‌دهد و با گذشت زمان این روند متغیر بوده و به‌طور نوسانی در حال تغییر می‌باشد. به‌نظر می‌رسد میانگین پروتئین کل همولنف با توجه به مساعد بودن و عدم استرس ناشی از تأثیرات افزایش دما و بیماری‌ها در این گروه‌ها یک حالت طبیعی را داشته و به‌طور نوسانی در طول مدت زمان مطالعه در حال تغییر می‌باشد. این روند احتمالاً می‌تواند ناشی از تغییرات فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب با گذشت زمان یا شاید به خاطر مکانیسم‌های ایمنی و هورمونی یا ژنتیکی شاه‌میگوها باشد. در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که میزان هموسیت‌های کل و پروتئین کل پلاسما در شاه‌میگوی آب شیرین با توجه به درجه حرارت مناسب آب آکواریوم ها جهت پرورش شاه میگوی آب شیرین (۱۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد) یک حالت طبیعی را دارد و میزان تغییرات ایجاد شده در طول مدت زمان این مطالعه معنی‌دار نبوده و ناشی از تغییرات مکانیسم بدنی و هورمونی شاه‌میگوها می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

تحقیق حاضرحاصل همکاری‌های موسسه تحقیقات شیلات ایران و کادر محترم مرکز تحقیقات آرتمیای کشور می‌باشد. بدینوسیله از پرسنل محترم این دو مجموعه بخصوص مسئول آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان جناب آقای مهندس شیری تشکر و قدردانی می‌نمایم.

## منابع

سام‌کوکیائی، آ. ۱۳۹۰. بررسی تجربی بیماری‌زائی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در شاه‌میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) با تا کید برتاثیر دما در روند بیماری‌زائی باکتری. پایان نامه دکتری تخصصی، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده تخصصی دامپزشکی، دانشگاه علوم و تحقیقات، ۱۰۱ صفحه.

Battison, A., Cawthorn, R. and Horney, B. 2003. Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobster infected with *Aerococcus viridians* Var. homari (Gaffkemia). Invert. pathol. 84: 177-197.

Coeurdacier, J.L., Dutto, G., Gasset, E. and blancheton, J.P. 2011. Is total serum protein a good indicator for welfare in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*)?. Aqua. Liv. Re. 24: 121-127.

Dawson, R. D. and Bortolotti, G.R. 1997. Total plasma protein level as an indicator of condition in wild American kestrels (Falco sparverius). J. Zool. 75: 680–686.

De le Court, C., Aguilera, E. and Recio, F. 1995. Plasma chemistry values of free-living white spoonbills (*Platalea leucorodia*). Com. Biochem Physiol. 112A: 137–141.

Gargioni, R. and Barracco, M.A. 1998. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. J. Morphol. 236: 209-221.

Gillespie, J.p., Kanost, M.R. and Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annual. Rev. Entomol. 42: 611-643.

Giulianini, P.G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella, S. and Ferrero, E.A. 2007. Ultra structural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater Crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell types and their role after invivo artificial non-self challenge. Micron. 38: 49-57.

Gross, P.S., Bartle, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W. 2001. Immunegene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the pacific white shrimp,

pallipes, *Astacus leptodactylus* and *Pasifastacus leniusculus*, Estuarine, Coast. Shelf. sci. 44:147-154.
Hose, J.H., Martin, G.G. and Gerard, A.S. 1990. Adecapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. Biol. Bullet. 178: 33-45.
Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. and Soderhall, K. 2006a. cell – mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunol. 211:213-236.
Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. and Soderhall, K. 2000. Crustacean hemocytes and haematopoiesis. Aqua. 191:45-52.
Jussila, J., Jago, J., Tsvetnenko, E., Dunstan, B. and Evans, L.H. 1997. Total and differential hemocyte counts in western rock lobsters (Panulirus Cygnus George) under post-harvest stress. Mar. Fwater. Re. 48: 863-867.
Kakoolaki, S., Sharifpour, I., Soltani, M., Mousavi, H.A.E., Mirzargar, S., and Rostami, M. 2010. Selected morpho-chemical features of hemocytes in farmed shrimp. *Fenneropenaeus indicus* in iran. I. J Fish. Sci. 9(2):219-232.
Liu, H. 2008. Functional studies of some immune relevant genes in a crustacean. Acta universitatis upsaliensis. Digital comprehensive summaries of Uppsala Dissert. Facul. Sci. technol. 435: 61p.
Lin, X. 2010. Hematopoiesis in a crustacean. Acta universitatis Upsaliensis. Digital comprehensive summaries of Uppsala Dissert Faculty. Sci. Technol. 723:46pp.
Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V.J., and Ferrero, E.A. 2001. Heavey metals affect the Circulating hemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. Fish. Shell. Immunol. 11: 459-472.
Matinfar, A. 2007. Prancipal program of Freshwater Crayfish *Astacus leptodactylus*. Jahad agriculture organization. I. Fish. Re. Organ. 10:118p.
Mix, M.C. and Sparks, A.K. 1980. Hemocyte classification and differential counts in Dungeness Crab Cancer magister. J. Invert. Pathol. 35(2): 134-143.
Mohajeri, J., Afsharnasab, M., Jalali, B., Kakoolaki, S., Sharifrohani, M., and Haghighi, A. 2011. Immunological and Histopathological changes in *Penaeus semisulcatus* challenged with *Vibrio harveyi*. I. J. Fish. Sci. 10(2): 254-265.
*Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. Dev. Com. Immunol. 25:565-577.
Holdich, D.M., Harlioglu, M.M. and Firkins, I. 1997. Salinity adaptations of crayfish in British waters with particular refrence to Austropotamobius
Ozbay, G. and Riley, G.J. 2002. An analysis of refractometry as a method of determining blood total protein concentration in the American lobster *Homarus americanus* (Milne Edwards). Aqua. Re. 33: 557-562.
Riche, M. 2007. Analysis of refractometry for determining total plasma protein in hybrid striped bass (*Morone chrysops* & *Morone saxatilis*) at various salinities. Aqua. 264: 279−284.
Rodriguez, J. and Le Moullac, G. 2000. State of the are of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aqua. 191:109-119.
Samcookiyaei, A., Afsharnasab, M., Razavilar, V., Motalebi, A., Asadpor, Y., Yahyazade, M.Y. and Nekouifard, A. 2012. Experimentally pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* in freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus*). I. J. Fish. Sci. 11(3): 644-656.
Schoech, S. T. and Bowman, R. 2003. Does differential access to protein influence differences in timing of breeding of Florida scrub-jays (*Aphelocoma coerulescens*) in suburban and wildland habitats? Auk. 120: 1114–1127.
Smith, V.J. 1991. Invertebrate immunology**:** phylogenetic, ecotoxicological and biomedial implications. Com. Haematol. Int. 1: 61-76.
Soderhall, K. and Smith, V.J. 1983. Separation of the haemocyte populations of Carcinus meanas and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Com. Immunol. 7:229-239.
Soderhall, K., Wingren, A., Johansson, M.W. and bertheussen, K. 1985. The cytotoxic reaction on of hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus astacus*. Cell. Immunol. 94(2): 326-332.
Soderhall, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opinion. Immunol, 10: 23-28.
Sritunyalucksana, K. and Soderhall, K. 2000. The proPo and cloting system in crustaceans. Aqua. 191: 53-69.

**Study of total hemocyte count and total plasma protein in immune system of freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus*)**

**Arash Samnejhad[1*] & Mohammad Afsharnasab[2]**

*1. Iranian Artemia Research Center, Orumia, Iran*
*2. Iranian Fisheries Research organization, Karajh, Iran*

## Abstract

In this study, hemocytes defence cells and total plasma protein had been studied in immune system of freshwater Crayfish *Astacus leptodactylus*. About one-hundered freshwater Crayfish *(A.leptodactylus*) with average weight of 25-40g were purchased from aras damreservours in west Azarbayjan province and transported to Iranian artemia research center of orumya province.(25 pieces of Crayfish were considered surplus for possible losses) Before experimernt the Crayfish were acclimated for two days in the laboratory and then disinfected by oxytetracycline antibiotic and finally, an equal number (15 pieces of Crayfish in each glass aquariums) transported to 5 glass aquariums. In order to study hemocyte and plasma total protein, the hemolymph samples were withdrawn from abdominal second segments of Crayfish in interval hours (0, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 240 and 336). Result showed that the mean of hemocytes was 27-114 CFU $ml^{-1}$, and the highest and lowest value of hemocytes were 180 and 12 CFU $ml^{-1}$ in 12 and 336 hours after experiment times, respectively. Also based on the results, the semigranular cells(SGC) and granular cells(GC) were approximately comprised about 58-65% and 28-37%, respectively and hyaline cells(HC) about was 3-6%. Based on total plasma protein results, the mean of total plasma protein was 1-2 Gr $dl^{-1}$, and the highest and lowest value of total plasma protein were 2/8 and 0/5 Gr $dl^{-1}$ in 12 and 336 hours after experiment times.

**Keywords**: Hemocytes, Granular cells, Semigranular cells, Hyaline cells, Total plasma protein

*Corresponding author, E-mail: Drsam.arash@gmail.com