دوره سیزدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.52760.1721

اثرات انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* (*Ichthyophthirius multifiliis*) پرتوتابی شده با اشعه‌ی گاما و پوشش دهی شده با نانوذرات فسفات کلسیم بر پاسخ‌های ایمونولوژیکی مخاط پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

نجمه شیخ‌زاده[۱*]، مرضیه حیدریه[۲]، منیره فلسفی[۳]، کتایون نفوذی[۴] و امیر تکمه‌چی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۸

چکیده

به منظور تهیه‌ی رادیو واکسن علیه انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* (*Ichthyophthirius multifiliis*)، عامل ایجاد بیماری لکه‌ی سفید در ماهیان آب شیرین، مطالعه‌ی حاضر انجام شد. انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* بعد از پرتوتابی با اشعه‌ی گاما با ادجوانت نانو ذره‌ی فسفات کلسیم پوشش‌دهی گردید و اثر واکسن تهیه شده بر سیستم ایمنی غیراختصاصی در مخاط پوست ماهی‌قزل آلای-رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. ماهی‌های با میانگین وزنی ۳۰ گرم پس از دوره‌ی سازگاری ۱۰ روزه ، به ۴ گروه تقسیم شدند: ۳ گروه با انگل پرتوتابی شده و پوشش‌دهی شده با نانو ذره‌ی فسفات کلسیم، انگل پرتوتابی شده و یا نانو ذره‌ی فسفات کلسیم به تنهایی، به صورت حمام واکسینه شدند. در گروه کنترل نیز هیچ‌گونه ترکیبی استفاده نشد. در روز ۲۰، نمونه‌برداری از مخاط پوست به منظور اندازه‌گیری پارامترهای ایمنی غیراختصاصی انجام شد. نتایج نشان داد که فعالیت لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز و همچنین تیتر هماگلوتیناسیون ماهیان تیمار شده با انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* پرتوتابی شده با اشعه‌ی گاما و پوشش‌دهی شده با نانو ذرات کلسیم فسفات بالاتر از گروه‌های دیگر بود. اما فعالیت استراز در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل تغییر نکرد. می‌توان این طور استنباط نمود که به کارگیری نانو ذره‌ی فسفات کلسیم فرموله شده در تروفونت‌های پرتوتابی شده *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* توانست ترکیبات ایمنی ذاتی در مخاط پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را بهبود ببخشد. مطالعات بعدی در خصوص بررسی اثرات این رادیو واکسن بر سیستم ایمنی اختصاصی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد نیاز می‌باشد.

کلمات کلیدی: *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس*، واکسن، ایمنی مخاطی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه

ماهی در محیط زیست خود به صورت مستقیم در معرض انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا قرار دارد. تحت شرایط نرمال، ماهی از مکانیسم‌های پیچیده‌ی دفاعی اعم از ترکیبات ایمنی اختصاصی و ذاتی برخوردار می‌باشد. از اجزای ایمنی ذاتی در ماهی می‌توان به لایه‌ی مخاطی در پوست نام برد که به وسیله‌ی سلول‌های جامی در اپیدرم ترشح می‌شود. در کنار کنده شدن و خروج عوامل بیماری‌زای سطحی از خلط پوست، تعداد زیادی از ترکیبات دفاعی مانند لیزوزیم، ایمونوگلوبین، کمپلمان، لکتین و بسیاری از ترکیبات ضد باکتریایی دیگر در مخاط پوست گونه‌های مختلف ماهی حضور دارند (Subramanian et al. 2007).

[۱*] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز E-mail: nsheikh@tabrizu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] استادیارگروه پژوهشی دامپزشکی و علوم دامی، پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج- ایران
[۳] دانش آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز
[۴] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز
[۵] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

با متراکم شدن سیستم پرورش ماهی، شیوع بیماری‌های مختلف عفونی و غیرعفونی نیز شدت یافته است. به عنوان مثال، انگل مژه‌دار ماهیان آب شیرین، *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* (*Ichthyophthirius multifiliis*)، که یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های ماهیان وحشی و پرورشی محسوب می‌شود، همه ساله خسارات اقتصادی چشم‌گیری را به صنعت آبزی‌پروری سراسر جهان وارد می‌نماید. کنترل انگل توسط درمان‌های شیمیایی، پس از نفوذ به پوست و آبشش‌ها مشکل است. هزینه‌ی بالای درمان و نگرانی عمومی از جهت امنیت غذایی و محیطی از دیگر مضرات درمان‌های شیمیایی محسوب می‌شوند (Straus 1993, Buchmann et al. 2003). بنابراین، واکسیناسیون علیه ایک می‌تواند به عنوان روشی جایگزین در پیش‌گیری از تلفات ماهی به کار گرفته شود (Maki and Dickerson 2003).

تا کنون ساخت واکسن علیه این عامل بیماری‌زا با استفاده از توموایت کشته از دو راه داخل صفاقی و حمام، توموایت زنده داخل صفاقی، تروفونت کشته، ترونت زنده به صورت داخل صفاقی در دو دمای بالا و پایین، برخی پروتئین‌های سطحی انگل مانند پروتئین بازدارنده‌ی حرکت (i-antigen = immobilization antigen) به صورت داخل صفاقی و به همراه اجوانت ناکامل فروند، ترونت غیرفعال شده با فرمالین و به صورت واکسیناسیون داخل صفاقی، تروفونت سونیکه شده عفونت تحت حاد با ترونت، تزریق i-antigen و استفاده از اولتراسوند به دنبال روش حمام دادن، انجام شده است (Alishahi and Buchmann 2006, He at al. 1997, Wang and Dickerson 2002, Xu et al. 2009).

پرتوتابی با اشعه‌ی گاما، روش جدیدی در غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها به منظور تولید واکسن می‌باشد (Syaifudin et al. 2011). این روش نسبت به روش‌های متداول غیرفعال‌سازی مانند حرارت و استفاده از مواد شیمیایی دارای مزایایی می‌باشد. در این روش تولید واکسن، با کشتن میکروارگانیسم‌ها ساختار آنتی‌ژنی عوامل بیماری‌زا تخریب نمی‌گردد، بنابراین در میزبان‌های واکسینه شده پاسخ‌های ایمنی قوی مشاهده می‌شود (Syaifudin et al. 2011, Heidarieh et al. 2014). ضمناً غیرفعال‌سازی در حجم‌های بالا و عدم نیاز به حذف مواد شیمیایی بعد از غیرفعال‌سازی از مزایای دیگر این روش می‌باشد (Seo 2015). در کل، تنها در یک مطالعه در آبزیان از رادیوواکسن‌ها استفاده شد. در این مطالعه، غیرفعال‌سازی مرحله‌ی تروفونت انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* با پرتو گاما با دوز ۱۵۰ گری انجام شد. متعاقب استفاده از تروفونت انگل غیرفعال شده به صورت حمام در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تقویت سیتم ایمنی مخاطی گزارش گردید (Heidarieh et al. 2014).

ادجوانت ماده‌ای شیمیایی است که به فعالیت شیمیایی ماده‌ی شیمیایی دیگر کمک می‌کند، خاصیت آنتی‌ژنی واکسن را تقویت کرده و با تحریک پاسخ ایمنی ذاتی، موجب ایجاد میانجی‌های مطلوب می‌گردند و سبب شروع سریع‌تر پاسخ ایمنی می‌شوند (Kierszenbaum and Tren 2011). تأثیر اجوانت در ماهی از طریق تحریک التهاب در موضع و رهاسازی آهسته‌ی آنتی‌ژن صورت می‌گیرد (Lie 2008). ناکارآمدی واکسن‌های امروزی به دلیل کمبود اجوانت‌های مناسب برای حمل واکسن آنتی‌ژن است. نانو ذرات و میکروذرات هر دو سیستم‌هایی بسیار مؤثر در حمل واکسن هستند. کلسیم‌فسفات یک ماده معدنی می‌باشد که از میکروذرات و نانوذرات آن به عنوان سیستم حمل واکسن استفاده شده است. کلسیم‌فسفات از نظر سازگاری زیستی، فعالیت زیستی و تجزیه‌پذیری از دیگر مواد معدنی مناسب‌تر است. کلسیم فسفات ترکیب طبیعی در بدن به شمار می‌رود و از همین رو به راحتی جذب شده، قابل تحمل بوده و امن می‌باشد. این ماده‌ی غیرسمی می‌باشد و تمایل بالایی به پروتئین‌ها، داروها و آنتی‌ژن‌ها دارد. از طرفی ساخت آن کم هزینه بوده و آسان است (Behera and Swain 2011). تنها در یک مطالعه، از نانو ذرات کلسیم فسفات به عنوان ادجوانت /

حامل واکسن در یک مدل ماهی روهو (*Labeo rohitu*) استفاده شده است (Behera and Swain 2011).

با توجه با اثرات مثبت رادیوواکسن تولید شده علیه انگل ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Heidarieh et al. 2014) و امکان افزایش کارایی این واکسن با به کارگیری ادجوانت نانو ذره فسفات کلسیم، مطالعه‌ی حاضر انجام شد تا اثرات انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* پرتوتابی شده با اشعه‌ی گاما و پوشش دهی شده با ادجوانت نانو ذره فسفات کلسیم بر سیستم ایمنی مخاطی در پوست ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

به منظور تکثیر انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* و پرتوتابی، ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده به انگل مورد مطالعه، در مزارع پرورش ماهی شناسایی شده و به آکواریوم‌های شیشه‌ای در دمای ۱۷–۱۸ درجه‌ی سانتی-گراد منتقل شدند. پس از تکثیر انگل‌ها در سطح بدن ماهی‌ها و ازدیاد آن‌ها، تروفونت‌ها از سطح بدن ماهی‌ها جمع‌آوری شده و شمارش شدند و در هر ویال ۱۰۰ عدد تروفونت انگل نگهداری شد. بعد از جمع‌آوری انگل‌های ایک در ویال‌ها، با دستگاه پرتوتابی گاما مدل ۲۲۰ و نسبت دوز ۴.۸ گری در ثانیه و دوز ۱۵۰ گری غیرفعال-سازی انجام شد. فرایند فعال‌سازی روی نمونه‌های تروفونت فریز شده و روی یخ خشک انجام شد.

جهت تهیه‌ی نانو ذره‌ی فسفات کلسیم، کلرید کلسیم ۱۲/۵ میلی‌مولار، فسفات‌سدیم‌دی‌بازیک ۱۲/۵ میلی‌مولار و سیترات‌سدیم ۱۵/۶ میلی‌مولار با یکدیگر مخلوط شده و به مدت ۴۸ ساعت هم زده شد. سپس برای تأیید تولید کلسیم فسفات کریستالینه از روش پراش پرتو ایکس (X-ray powder diffraction = XRD) استفاده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه سونیکه شد تا نانو ذرات کلسیم فسفات به دست آید (He et al. 2002).

روش پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic light scattering = DLS) برای سنجش توزیع اندازه‌ی ذرات به کار گرفته شد. آنالیز DLS در طول موج ۵۳۲ نانومتر در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و زاویه‌ی ۹۰ درجه انجام شد. یک میلی‌گرم از نانو ذرات کلسیم فسفات سنتز شده در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سنجش اندازه‌ی ذرات انجام شد (Behera and Swain 2011).

در ترکیب انگل پرتوتابی شده با نانو ذره، ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نانو ذره فسفات‌کلسیم به PBS با pH برابر ۷/۵ اضافه شد و توسط سونیکاتور با شدت ۳۸ درصد به مدت دو دقیقه سونیکه شد. هر ویال حاوی ۱۰۰ عدد تروفونت انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* غیرفعال شده با یک میلی‌لیتر از PBS مخلوط شده و با چهار میلی‌لیتر از محلول نانوذره در PBS روی شیکر به مدت شش ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ترکیب گردید. سپس نمونه‌ها در 8000 g سانتریفوژ و با آب مقطر شسته شدند. سپس در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند و تا زمان مصرف منجمد شدند (Behera and Swain 2011).

در طراحی آزمایشگاهی این تحقیق، دویست و چهل قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سالم با متوسط وزن ۳۰ گرم از یک مزرعه پرورش ماهی در شهر کرج خریداری شدند. ماهی‌ها به صورت مساوی در ۴ گروه با سه تکرار در ۱۲ آکواریوم شیشه‌ای ۱۲ لیتری حاوی سیستم مدار بسته و با درجه‌ی حرارت آب تنظیم شده در حدود ۱۷–۱۸ سانتی‌گراد به صورت مستقل توزیع گردیدند به صورتی که در هر آکواریوم ۲۰ قطعه ماهی قرار داده شد. بعد از دوره‌ی سازگاری ۱۰ روزه، ماهی‌ها آماده جهت حمام دادن با واکسن گردیدند. در این مطالعه گروه‌بندی مورد نظر به صورت ذیل بود:

در تیمار ۱، در هر آکواریوم از ترکیب انگل پرتوتابی شده با نانو ذره‌ی حاوی ۱۰۰ عدد تروفونت انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* غیرفعال شده با پرتو گاما پوشش دهی شده با چهار میلی‌لیتر از محلول نانو ذره (حاوی ۴۰ میلی‌گرم نانو ذره فسفات‌کلسیم) به صورت

حمام استفاده شد. در تیمار ۲، در هر آکواریوم از ۱۰۰ عدد تروفونت انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* غیرفعال شده با پرتو گاما به صورت حمام استفاده شد. در تیمار ۳، چهار میلی‌لیتر از محلول نانو ذره (حاوی ۴۰ میلی‌گرم نانو ذره‌ی فسفات‌کلسیم) به صورت حمام به هر آکواریوم اضافه گردید. در گروه کنترل نیز از هیچ گونه انگل پرتوتابی شده یا ادجوانت استفاده نشد.

جهت جمع‌آوری و آماده‌سازی مخاط، بیست روز بعد از واکسیناسیون، نمونه‌برداری از مخاط ماهی‌ها انجام شد. بدین منظور، همه‌ی ماهی‌های موجود در هر آکواریوم صید شده و پس از بی هوشی، مخاط جلدی ماهی‌ها به آرامی با استفاده از کاردک پلاستیکی نرم جمع‌آوری گردید. در حین نمونه‌گیری برای جلوگیری از آلوده شدن نمونه‌ها با خون یا ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال، دقت شد تا به پوست آسیبی نرسد. نمونه‌ها با چهار برابر حجم بافر تریس (NaCl 150mM, 8Mm Tris-HCl, pH=5) هموژن شده، در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و مایع رویی لیوفیلیزه گردید. پودر لیوفیلیزه در بافر تریس حل شده و مخاط حل نشده با سانتریفوژ جدا شد. در ادامه، مایع رویی با استفاده از جریان ملایم گاز ازت تغلیظ شده و پس از عبور از فیلتر میلی پور به عنوان عصاره‌ی مخاطی تا زمان استفاده منجمد گردید. در اولین گام آزمایش، محتویات پروتئین مخاط با استفاده از روش برادفورد (Bradford 1976) و گاماگلوبولین گاوی به عنوان استاندارد آنالیز شد و برای محاسبه فعالیت‌های آنزیمی منظور گردید.

جهت بررسی میزان فعالیت لیزوزیم عصاره‌ی موکوس از روش ارئه شده توسط Sheikhzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ استفاده شد. بدین منظور، پس از تهیه نمودن ۰/۷۵ میلی‌گرم باکتری *میکروکوکوس لیزودیکتیکوس* (سیگما) در میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات ۰/۱ مولار با pH ۸/۵، ۲۵ میکرولیتر عصاره‌ی موکوس با ۱۷۵ میکرولیتر بافر سیترات فسفات در میکروپلیت‌های الیزا مخلوط گردید. جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر برای ۳۰ دقیقه به طور پیوسته اندازه‌گیری شد. مقداری از موکوس که سبب ۰/۰۰۱ کاهش میزان جذب در مدت زمان یک دقیقه گردید به عنوان یک واحد در میلی‌گرم در نظر گرفته شد.

بررسی آلکالین فسفاتاز با روش ارائه شده توسط Palashka و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد. نمونه‌های مخاط با میزان هم حجم از پی نیترو فنل فسفات ۴ میلی‌مولار، تهیه شده در آمونیوم بی‌کربنات ($100(NH_4HCO_3)$ میلی‌مولار حاوی کلرید منیزیوم با ۷/۸ pH انکوبه شد. تغییرات در میزان جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت به صورت پیوسته اندازه‌گیری شد. مقداری از آنزیم که سبب آزاد نمودن ۱ میلی‌مول از ترکیب پی نیتروفنل در مدت زمان یک دقیقه گردید، به عنوان ۱ واحد فعالیت آلکالین فسفاتاز منظور گردید. برای پی نیترو فنل ضریب extinction coefficient برابر ۱۰۴×۱/۷۸ مول در سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

فعالیت استراز مطابق روش ارائه شده توسط Kj و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد. انکوباسیون حجم برابری از نمونه‌ی مخاط با ۴ mM پارا نیتروفیل میریستات در ۱۰۰ mM بافر آمونیوم بی‌کربنات حاوی ۰/۵ درصد تریتون X-۱۰۰، pH ۸/۷ در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

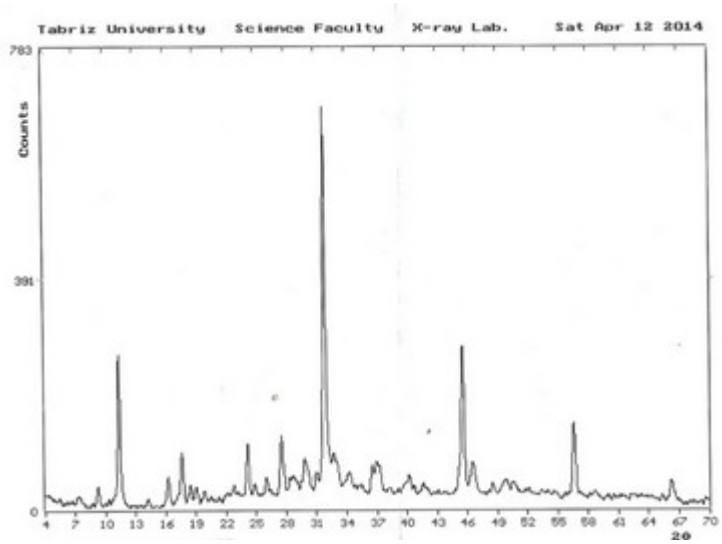
طبق پروتوکل ارائه شده توسط Sheikhzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲، سوسپانسیون گلبول قرمز طیور ۲/۵ درصد (C-RBC) در بافر تریس تهیه شد. در میکروپلیت‌های ته گرد، ۴۵ میکرولیتر از عصاره‌ی مخاط (معادل ۳۱/۵ میکروگرم پروتئین) به اولین گوده اضافه شد و رقیق‌سازی سریالی با بافر تریس از گوده‌ی دوم تا هشتم انجام شد. حجم برابری از گلبول قرمز طیور ۲/۵ درصد به گوده‌ها افزوده شد. بعد از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، عکس رقت بالاترین میزان تیتر با آگلوتیناسیون مشخص به عنوان تیتر هماگلوتیناسیون در نظر گرفته شد.

روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) همراه با روش کم‌ترین اختلاف معنی‌دار (Least Significant Difference = LSD) جهت مقایسه‌ی گروه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ نیز به عنوان مبنا در نظر گرفته شد.

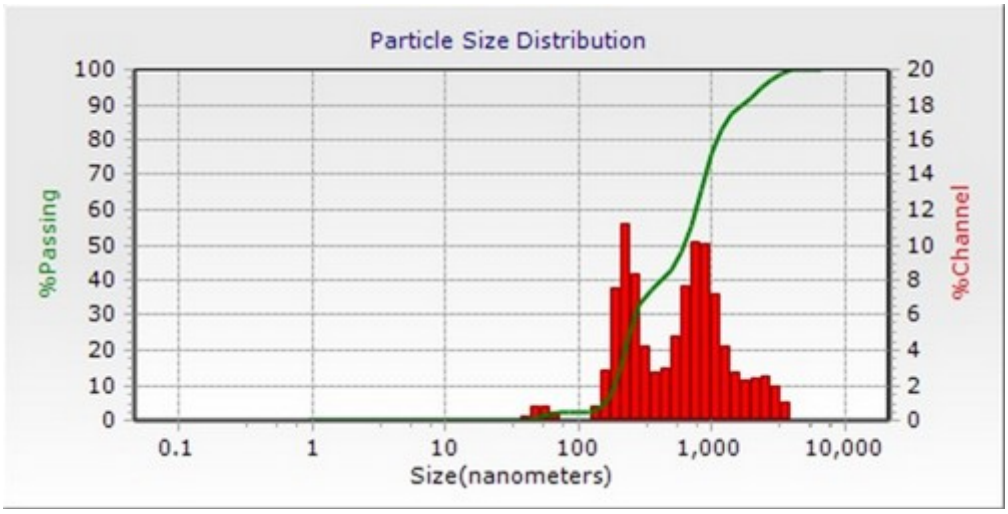
نتایج

با استفاده از روش XRD که مبتنی بر پراش اشعه‌ی X می‌باشد، مشخص شد که ماده‌ی تولید شده، کلسیم فسفات کریستالینه می‌باشد (شکل ۱).

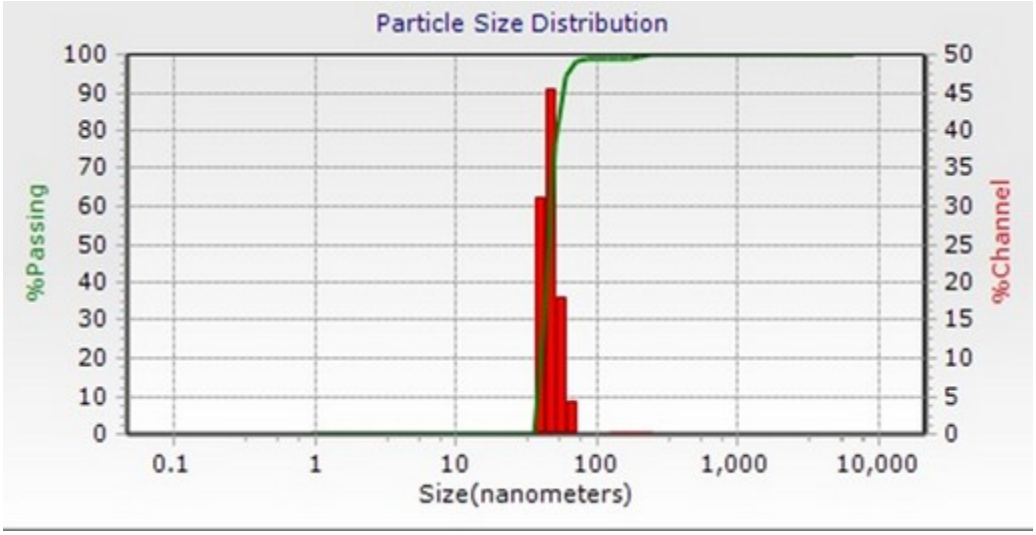
در نمونه‌ی مورد مطالعه‌ی ما، ۸۰ درصد نانو ذرات کلسیم فسفات بر حسب معیار شدت، اندازه‌ای کم‌تر از ۱/۲ میکرون نشان دادند (شکل ۲) و بر حسب معیار تعداد، ۹۵ درصد نانو ذرات اندازه‌ای کم‌تر از ۶۱/۸ نانومتر داشتند (شکل ۳) و میانگین اندازه‌ی نانو ذرات ۴۹/۳ نانومتر به دست آمد.



شکل ۱: پراش پرتو ایکس حاصل از کلسیم فسفات کریستالینه



شکل ۲: توزیع اندازه‌ی ذرات بر حسب معیار شدت



شکل ۳: توزیع اندازه‌ی ذرات بر حسب معیار تعداد

تفاوت‌های بارزی در سطوح پروتئینی مخاط، میان ماهی‌های گروه‌های مختلف مشاهده نشد. ماهیان تمام گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل فعالیت لیزوزومی بسیار بالاتری داشتند. فعالیت لیزوزیم در تیمار ۱ نسبت به دو تیمار ۲ و ۳ از سطح بالاتری برخوردار بود. افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در تمام گروه‌های تیمار مشاهده شد. مشابه فعالیت لیزوزیم، فعالیت آلکالین فسفاتاز در تیمار ۱، سطح بالاتری را در مقایسه با گروه‌های دیگر نشان داد. در این مطالعه فعالیت استراز در هیچ یک از گروه‌های تیمار افزایشی پیدا نکرد. ضمن این که، مخاط پوست در تیمار ۱ و ۲ به طور موفقیت‌آمیزی توانست گلبول‌های قرمز را آگلوتینه کند، در صورتی که در گروه کنترل هیچ گونه فعالیت آگلوتینه نمودن گلبول‌های قرمز مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱: ترکیبات مختلف در موکوس ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دریافت کننده‌ی واکسن به صورت حمام

گروه‌های مورد مطالعه	غلظت پروتئین (گرم در دسی‌لیتر)	فعالیت لیزوزیم (واحد در میلی‌گرم)	فعالیت آلکالین فسفاتاز (واحد در میلی‌گرم)	فعالیت استراز (واحد در میلی‌گرم)	تیتر هماگلوتیناسیون
کنترل	۰/۲۵۷ ± ۰/۰۷۲ a	۱/۰۲۱ ± ۰/۰۴۲ a	۰/۴۶۴ ± ۰/۰۲۴ a	۰/۲۸۰ ± ۰/۰۱۱ a	۰ a
تیمار ۱	۰/۲۷۴ ± ۰/۰۱۸ a	۶/۵۸۰ ± ۰/۲۴۸ c	۲/۲۷۰ ± ۰/۰۹۵ C	۰/۳۶۸ ± ۰/۰۰۲ a	۱۶b
تیمار ۲	۰/۲۴۲ ± ۰/۰۵۱ a	۲/۴۵۰ ± ۰/۰۸۰ b	۰/۹۴۸ ± ۰/۰۷۰ b	۰/۳۰۱ ± ۰/۰۲۴ a	۹/۰۰۰ ± ۴/۰۴۱ b
تیمار ۳	۰/۳۳۱± ۰/۰۱۲ a	۲/۸۷۰ ± ۰/۱۵۱ b	۰/۹۸۰ ± ۰/۰۱۲ b	۰/۲۷۵ ± ۰/۰۸۰ a	۸/۰۰۰ ± ۴/۶۱۸ ab

تیمار ۱: دریافت کننده‌ی ۱۰۰ عدد تروفونت انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* غیرفعال شده با پرتو گاما پوشش دهی شده با نانوذره فسفات کلسیم به صورت حمام؛ تیمار ۲: دریافت کننده‌ی ۱۰۰ عدد تروفونت انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* غیرفعال شده با پرتو گاما به صورت حمام؛ تیمار ۳: دریافت کننده‌ی نانو ذره‌ی فسفات کلسیم به صورت حمام. داده‌ها شامل میانگین ± خطای معیار می‌باشد. اعداد ارائه شده در هر ستون با حروف متفاوت معنی‌دار می‌باشد.

بحث

با استفاده از روش DLS که پس از سونیکاسیون انجام شد، دو نمودار به دست آمد. در نمودار توزیع اندازه‌ی ذرات بر حسب شدت، اندازه‌ی ذرات بر حسب میزان بازتاب نور سنجیده می‌شود و به همین دلیل ذرات بزرگ‌تر که نور بیش‌تری را بازتاب می‌دهند، حتی اگر تعداد کمی داشته باشند، می‌توانند بر نانو ذرات غلبه کرده و آن‌ها را پنهان کنند. اما در نمودار تعداد، توزیع اندازه‌ی ذرات بر حسب تعداد نانو ذرات موجود سنجیده می‌شود. در این نمودار نیز تنها ذراتی که به اندازه‌ی نانو رسیده‌اند خود را نشان می‌دهند. از این رو استفاده از هر دو نمودار به صورت مکمل پاسخ بهتری را نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ی حاضر، تأثیرات انگل ایک که نانو ذرات کلسیم فسفات جذب کرده است، روی ترکیبات مخاط ماهی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های مخاطی لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز در تمام گروه‌های تیمار افزایش یافته است که این افزایش در گروهی که تحت تابش اشعه‌ی گاما قرار گرفته و نانوذرات کلسیم فسفات جذب کرده بودند در سطح بالاتری قرار داشت. آگلوتیناسیون گلبول قرمز به استثنای گروهی که تنها با نانوذرات کلسیم فسفات تیمار شده بودند، در بقیه گروه‌ها مشاهده گردید.

نقش حفاظتی مخاط پوست ماهی به عنوان اولین خط دفاعی علیه عوامل بیماری‌زا مشخص است. مخاط به طور مداوم در حال تولید و ترشح از سطح پوست است، بنابراین، به طور فیزیکی سبب گیر افتادن و ممانعت از اتصال عوامل میکروبی به سطح اپیتلیوم و در نتیجه مانع ایجاد فرصتی جهت تهاجم به بافت‌های ماهی خواهد بود. مخاط همچنین حاوی موادی با فعالیت ضد میکروبی می‌باشد که نقش اصلی را در سیستم دفاعی ماهی بر عهده دارند (Sheikhzadeh et al. 2012). لیزوزیم، به عنوان آنزیم ضدباکتریایی سیستم ایمنی ذاتی، در بافت‌ها و اعضای مختلفی از گونه‌های متعددی ماهی، که در تماس مداوم با میکروارگانیسم‌ها بوده‌اند مورد مطالعه قرار گرفته است (Sheikhzadeh et al. 2012). در این مطالعه، همه‌ی گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار در میزان لیزوزیم مخاط پوست را نشان دادند. در کل، در مخاط ماهی واکسینه شده در حمام انگل ایک که تحت تابش اشعه‌ی گاما و نانو ذرات کلسیم فسفات قرار گرفته بود، بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم مشاهده شد. به طور مشابه، در مطالعه‌ی قبلی نیز در گروه تیمار شده با تروفونت‌های انگل ایک که تحت تابش اشعه ۱۵۰ گری بوده‌اند فعالیت بالای لیزوزیم در مخاط پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان دیده شد (Heidarieh et al. 2013).

آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که نقش حمایتی را در گونه‌های مختلف ماهی در طی استرس، آلودگی‌های انگلی و ترمیم زخم بر عهده دارد (Sheikhzadeh et al. 2012). نتایج حاضر نشان داد که همانند فعالیت لیزوزیم، فعالیت آلکالین فسفاتاز نیز در تمام گروه‌های تیمار افزایش چشم‌گیری داشته است و این افزایش در گروه تیمار شده با انگل تحت تابش اشعه‌ی گاما و نانو ذرات کلسیم فسفات بیش‌تر بوده است. نقش حفاظتی این پارامتر توسط (Iger and Abraham 1990) در طی روند ترمیم زخم در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نشان داده شده است (Ross et al. 2000, Iger and Abraham 1990). نیز افزایش سطح آلکالین فسفاتاز را در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Atlantic salmon) که به وسیله‌ی انگل خارجی *لپوفتریوس سالمونیس* آلوده شده بود، مشاهده کردند (Ross et al. 2000). به نظر می‌رسد که افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های مختلفی مانند آلکالین فسفاتاز و لیزوزیم ترشح شده به مخاط در تمام ماهیان تیمار شده، به تنهایی یا به همراه دیگر مواد ایمنی موجود در مخاط که در برخورد با پاتوژن‌ها ایجاد می‌شوند، رخ می‌دهد.

آگلوتینین‌ها گروهی از گلیکوپروتئین‌های مربوط به ایمنی ذاتی هستند که قادر به آگلوتینه کردن سلول‌ها، گلیکوکونژوگه‌ها و مولکول‌ها می‌باشند. هماگلوتینین‌ها با فعالیت بالقوه‌ی ضدمیکروبی از موکوس پوست تعداد زیادی از گونه‌های ماهی گزارش شده‌اند (Palashka et al. 2008). در این مطالعه، آگلوتینه شدن گلبول‌های قرمز در گروه تیمار شده با انگل تحت تابش اشعه‌ی گاما و نانو ذرات کلسیم فسفات و نیز در گروه تیمار شده با انگل تحت تابش اشعه‌ی گاما مشاهده گردید. در مطالعه‌ی قبل، روی فلاندر زیتونی (Olive flounder)، مخاط پوست به طور موفقیت‌آمیزی توانست گلبول‌های قرمز خرگوش را آگلوتینه کند (Palashka et al. 2008). به نظر می‌رسد که تحریک مواد شبه آگلوتینین می‌تواند نقشی حیاتی در مکانیسم ایمنی ذاتی در گونه‌های مختلف ماهی ایفا کند.

فرض بر این است که تقویت سیستم ایمنی مخاطی در پوست ماهی تیمار شده با تروفونت‌های تحت تابش اشعه‌ی گاما عمدتاً به دلیل افزایش تعداد سلول‌های مخاطی و در نتیجه رهاسازی سریع محتوای سلول‌های مخاطی به عنوان پاسخ دفاعی، صورت گرفته است (Heidarieh et al. 2013). در ضمن، این مطالعه بیان می‌کند که نانو ذرات کلسیم فسفات به ماندگاری پاسخ ایمنی در ماهی کمک می‌کند. نانو ذرات کلسیم فسفات در برابر نمک‌های صفراوی و لیپاز مقاوم هستند. به راحتی، بدون ایجاد هیچ نوع التهابی در محل تزریق جذب شده و سبب تقویت ایمنی در یک دوره‌ی زمانی طولانی و نیز کاهش مقدار آنتی‌ژن مورد نیاز برای ایمنی‌زایی می‌گردند. این ذرات در نهایت منجر به تقویت پاسخ ایمنی می‌شوند (Behera and Swain 2014). علاوه بر این، دیده شده است که نانو ذرات کلسیم فسفات سبب القای ایمنی اختصاصی در ماهی روهو (*Labeo rohitu*) شده‌اند (Behera and Swain 2014). به طور مشابه، نانو ذرات کلسیم فسفات به عنوان اجوانت مخاطی مؤثری برای واکسن‌های نوکلئوتیدی انسانی به کار رفته‌اند (He et al. 2002). در این مطالعه، محققین دریافتند که میکرو ذرات، اجوانت‌های قدرتمندی برای انتقال مخاطی محسوب می‌شوند اما در القای ایمنی سلولی مناسب نیستند (He et al. 2002). در کل، اعتقاد بر این است که سلول‌های M، سلول‌های دندریتی، ماکروفاژها و عقده‌های لنفاوی موضعی در برداشت ذرات کوچک‌تر مؤثرتر عمل می‌کنند. خوشبختانه نانو ذرات کلسیم فسفات عموماً در اندازه‌ی مناسبی قرار دارند (یعنی کم‌تر از ۱/۲ میکرون) و می‌توانند سبب تحریک ایمنی سلولی و پاسخ لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک شوند (He et al. 2002). بر اساس این نتایج، این محققین دریافتند که واکسن تحت واحد HSV-2 که بر پایه‌ی نانو ذرات کلسیم فسفات ساخته شده است سبب القای همزمان ایمنی سیستمیک و مخاطی می‌گردد. در ضمن، این نانو ذرات قدرت بالایی را به عنوان اجوانت ایمن و مؤثر در واکسن‌های انسانی نشان داده‌اند، زیرا فاقد اثرات جانبی و القای آنتی‌بادی IgE می‌باشند (He et al. 2002). در مطالعه‌ی بافتی (Behera and Swain 2011) نیز نانو ذرات کلسیم فسفات هیچ گونه عوارض جانبی را در ماهی ایجاد نکرد (Behera and Swain 2014).

در نتیجه، این مطالعه به وضوح نشان می‌دهد که استفاده از نانو ذرات کلسیم فسفات فرموله شده در تروفونت‌های انگل ایک که تحت تابش اشعه‌ی گاما قرار گرفته بودند قادر است به طور بارزی ترکیبات ایمنی ذاتی را در مخاط قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش دهد. این، به دلیل بالاتر بودن فعالیت لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز و همچنین تیتر هماگلوتیناسیون ماهیان تیمار شده با انگل‌هایی که تحت تابش اشعه‌ی گاما قرار گرفته و نانو ذرات کلسیم فسفات جذب کرده‌اند، در مقایسه با گروه تیمار شده با نانو ذرات کلسیم فسفات و گروه تیمار شده با انگل‌های تحت تابش اشعه‌ی گاما می‌باشد و بیان‌گر تأثیرات مثبت روی سیستم ایمنی ماهی ایمن شده است.

با توجه به این که در واکسیناسیون، اندازه‌گیری پارامترهای ایمنی اختصاصی نیز فاکتور بسیار مهمی است، در مطالعه‌ی آینده تیتر آنتی بادی علیه انگل *ایکتیروفتیریوس مولتی فیلیس* و نیز میزان تلفات پس از چالش با انگل زنده مد نظر قرار گرفته است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تبریز و پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای و آژانس بین المللی انرژی اتمی (IAEA) انجام گرفته است.

منابع

Alishahi, M. and Buchmann, K. (2006). Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. Diseases of Aquatic Organisms, 72: 269-273.

Behera, T. and Swain, P. (2011). Antigen adsorbed calcium phosphate nanoparticles stimulate both innate and adaptive immune response in fish, *Labeo rohita* H. Cellular Immunology, 271: 350-359.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Analytical biochemistry, 72: 248-254.

Buchmann, K.; Jensen, P.B. and Kruse, K.D. (2003). Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: in vitro experiments. North American Journal of Aquaculture, 65: 21-24.

He, Q.; Mitchell, A.R.; Johnson, S.L.; Wagner-Bartak, C.; Morcol, T. and Bell, S.J. (2000). Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 7(6), 899-903.

He, Q.; Mitchell, A.; Morcol, T. and Bell, S.J.D. (2002). Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 9: 1021-1024.

He, J.; Yin, Z.; Xu, G.; Gong, Z.; Lam, T.J. and Sin, Y.M. (1997). Protection of goldfish against *Ichthyophthirius multifiliis* by immunization with a recombinant vaccine Aquaculture, 158: 1-10.

Heidarieh, M.; Mirvaghefi, A.R.; Sepahi, A.; Sheikhzadeh, N.; Shahbazfar, A.A. and Akbari, M. (2013). Effects of dietary *Aloe vera* on growth performance, skin and gastrointestine morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13: 367-373.

Heidarieh, M.; Hedayati Rad, M.; Mirvaghefi, A.R.; Diallo, A.; Mousavi, S.; Sheikhzadeh, N. and Shahbazfar, A.A. (2014). Effect of gamma irradiation on inactivation of *Ichthyophthirius multifiliis* trophonts and its efficacy on host response in experimentally immunized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 38: 388-393.

Iger, Y. and Abraham, M. (1990).The process of skin healing in experimentally wounded carp. Journal of Fish Biology, 36: 421-437.

Kierszenbaum, A. and Tres, L. (2011). Histology and cell biology: An Introduction to Pathology. Elsevier publishing . P: 720.

Kj, P.; Shin, G.W.; Kim, Y.R. and Jung, T.S. (2008). Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology, 24:479-488.

Lie, Ø. (2008). Improving Farmed Fish Quality and Safety. Woodhead, Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 162. E-ISBN: 978-1-84569-492-0.

Maki, J.L. and Dickerson H.W. (2003). Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 10: 876-881.

Ross, N.W.; Firth, K.J.; Wang, A.; Burka, J.F. and Johnson, S.C. (2000). Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. Diseases of Aquatic Organisms, 41: 43-51.

Seo, H.S. (2015). Application of radiation technology in vaccines development. Clinical and Experimental Vaccine Research, 4: 145-158.

Sheikhzadeh, N.; Karimi Pashaki, A.; Nofouzi, K.; Heidarieh, M. and Tayefi-Nasrabadi, H. (2012). Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 32: 407-410.

Straus, D.L. (1993). Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in channel catfish fingerlings by copper sulfate treatment. Journal of Aquatic Animal Health, 5: 152-154.

Subramanian, S.; MacKinnon, S.L. and Ross, N.W. (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology, 148: 256-263.

Syaifudin, M.; Tetriana, D.; Darlina, D. and Nurhayati, S. (2011) The feasibility of gamma irradiation for developing malaria vaccine. Atom Indonesia, 37: 91-101.

Wang, X., & Dickerson, H.W. (2002). Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9:176–181.

Xu, D.H.; Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A. (2009). Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish and Shellfish Immunology, 26: 614-618.

Effects of gamma-irradiated *Ichthyophthirius multifiliis* coated with calcium phosphate nanoparticles on immunological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin mucus

Sheikhzadeh, N.[1]; Heidarieh, M.[2]; Falsafi, M.[3]; Nofouzi, K.[4] and Tukmechi, A.[5]

Received: 02.04.2016 Accepted: 08.08.2016

Abstract

The current study was performed to prepare a radiovaccine against *Ichthyophthirius multifiliis*, the causative agent of white spot in fresh water fishes. After irradiation with gamma-ray, *Ichthyophthirius multifiliis* parasites were coated with calcium phosphate nanoparticles and then effects of prepared vaccine on non-specific immune system in rainbow trout skin mucus were evaluated. After 10 days adaption period, fish with mean weight 30 gram were distributed to 4 groups: Three groups were bath-vaccinated with gamma-irradiated *Ichthyophthirius multifiliis* coated with nano calcium phosphate, gamma-irradiated *Ichthyophthirius multifiliis* or nano-calcium phosphate alone. In control group, no additives were used. On day 20, skin mucus from treated fish was analyzed for evaluating the innate immune parameters. Results showed that lysozyme and alkaline phosphatae activities and hemagglutination titer of fish treated with gamma-irradiated *Ichthyophthirius multifilis* coated with calcium phosphate nanoparticle were higher than other groups. But esterase activity in treatment groups did no change in comparison with the control group. It can be assumed that use of calcium phosphate nanoparticle formulated in gamma-irradiated *Ichthyophthirius multifilis* trophonts could enhance the innate immunity components in rainbow trout skin mucus. Further studies are needed to evaluate the effects of this radiovaccine on specific immune responses in rainbow trout.

Key words: *Ichthyophthirius multifiliis*, Vaccine, Mucosal immunity, Rainbow trout

1- Associate Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Assistant Professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran
3- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Sheikhzadeh, N., E-mail: nsheikh@tabrizu.ac.ir