اثرات پپتید ضدمیکروبی هپسیدین ماهی آزاد دریای خزر در کنترل باکتری بیماریزای *Streptococcus iniae* در شرایط درون‌تنی و بررسی اثر آن بر بیان ژن‌های سایتوکین در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

- **ایمان شیردل:** گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **محمدرضا کلباسی*:** گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **سامان حسینخانی:** گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- **حامد پاک‌نژاد:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

هپسیدین‌ها گروهی از پپتیدهای ضدمیکروبی غنی از سیستئن هستند که در ماهیان علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و هم‌چنین ویروس‌ها فعال هستند. هدف از انجام تحقیق حاضر، استفاده از پپتید سنتتیک هپسیدین ماهی آزاد دریای خزر (CtHep) برای کنترل باکتری *Streptococcus iniae* در شرایط درون‌تنی و هم‌چنین مطالعه اثرات تنظیم ایمنی این پپتید در ماهی آزاد دریای خزر می‌باشد. بچه ماهیان آزاد دریای خزر با میانگین وزنی ۲۰ گرم به‌مقدار ۱ میکروگرم به ازای هر گرم ماهی با پپتید سنتتیک CtHep تزریق شدند و سپس در معرض باکتری S. iniae قرار داده گرفتند. بعد از ۲٤ ساعت، مقدار بیان ژن‌های سایتوکین و میزان بار باکتریایی کل در بافت‌های کلیه و طحال در تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. میزان زنده‌مانی ماهیان نیز تا روز دهم بررسی شد. بیان ژن‌های IL-1β، IL-6 و TNF-α در تیمارهای دریافت‌کننده CtHep به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. به‌علاوه، میزان بار باکتریایی کل در بافت‌های کلیه و طحال در ماهیان آلوده شده به باکتری *S. iniae* که CtHep دریافت کرده بودند به‌طور معنی‌داری کم‌تر از ماهیان آلوده شده‌ای بود که CtHep دریافت نکرده بودند. درصد زنده‌مانی در ماهیان آلوده شده به باکتری *S. iniae* که پپتید CtHep دریافت کرده بودند، به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از ماهیان آلوده‌ای بود که پپتید دریافت نکرده بودند. مطالعه اخیر نشان می‌دهد که پپتید ضدمیکروبی هپسیدین ماهی آزاد دریای خزر پتانسیل استفاده به‌عنوان عامل ضدمیکروبی و هم‌چنین به‌عنوان محرک ایمنی در آبزی‌پروری را دارد.

کلمات کلیدی: پپتید ضدمیکروبی، هپسیدین، ماهی آزاد دریای خزر، بیان ژن، سایتوکین

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

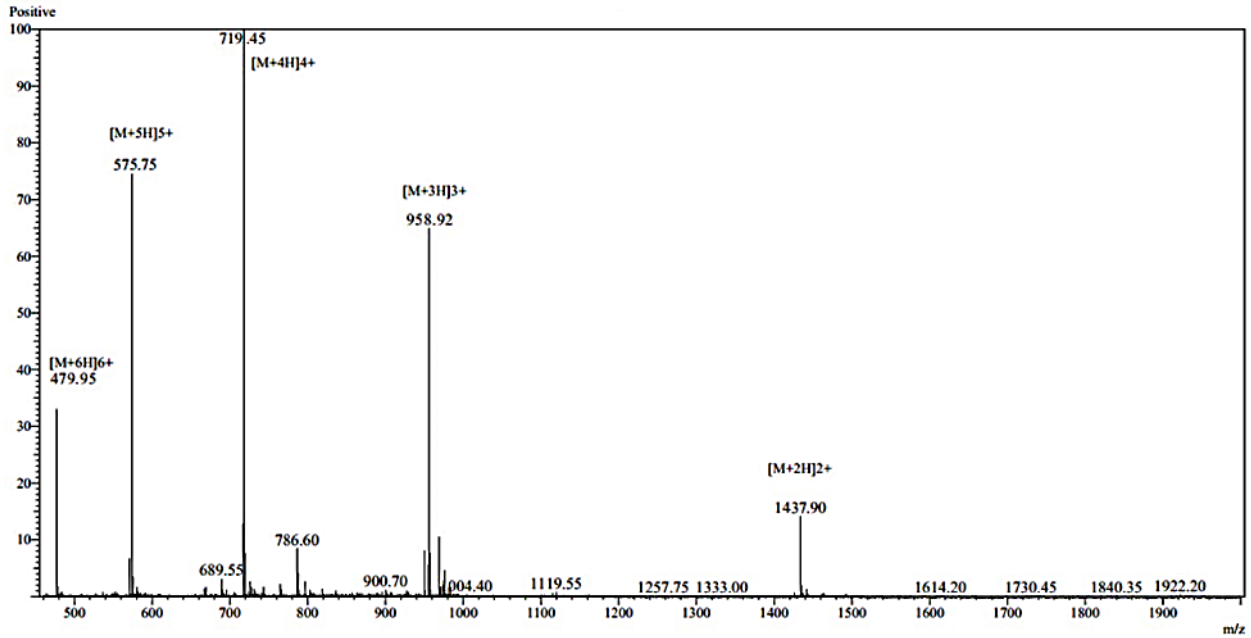
مقدمه

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌ها باعث ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده است و این نوع پاتوژن‌ها باعث شیوع گسترده‌تر بیماری‌های عفونی می‌شوند که کنترل آن‌ها را دشوارتر می‌نماید. بنابراین یکی از مهم‌ترین چالش‌های حوزه پزشکی و دامپزشکی در قرن ۲۱، توسعه روشی مؤثر برای کنترل باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌باشد. یکی از راه‌کارهای پیش‌رو، جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم با پپتیدهای ضدمیکروبی می‌باشد (Ingham و Moore، ۲۰۰۷؛ Casadei، ۲۰۱۱). در طول سال‌های گذشته، یک کلاس از آنتی‌بیوتیک‌های جایگزین، یعنی پپتیدهای ضد میکروبی، به‌دلیل مکانیسم‌های مختلف عملکردی و هم‌چنین فعالیت ضدمیکروبی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و هم‌چنین قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس‌ها، توجه زیادی را در حوزه داروسازی به‌خود جلب کرده است (Aoki و همکاران، ۲۰۱۲؛ Brogden و همکاران، ۲۰۰۳؛ Hancock و Lehrer، ۱۹۹۸). پپتیدهای ضدمیکروبی گروه متنوعی از خانواده‌های مختلف پپتیدهای حفاظت شده می‌باشند که به‌طور گسترده در اغلب موجودات اعم از نرم‌تنان، سخت‌پوستان و مهره‌داران وجود دارند و در سیستم ایمنی ذاتی آن‌ها نقش ایفا می‌کنند. این ترکیبات، پپتیدهایی کوچک (معولاً حاوی کم‌تر از ۴۰ اسیدآمینه)، آمفیپاتیک (دارای دو سر آب‌دوست و آب‌گریز) و عموماً کاتیونی هستند که به‌طور اختصاصی قادر به کشتن میکروب‌ها می‌باشند (Douglas، ۲۰۱۲). این پپتیدها معمولاً در پاسخ به عفونت و غالباً توسط سلول‌های ایمنی گردش خون و سلول‌های اپی‌تلیال لوله گوارش و پوست ترشح می‌شوند (Douglas، ۲۰۱۲). پپتیدهای ضدمیکروبی کاتیونی هستند و بنابراین به‌راحتی به غشاهای سلولی که دارای بار منفی هستند متصل شده و از این طریق قادر به تخریب یا حتی نفوذ به غشای سلول می‌باشند (Douglas، ۲۰۱۲). این پپتیدها که به پپتیدهای دفاعی میزبان نیز معروف هستند، میلیون‌ها سال در طبیعت و در پیکر سایر موجودات حضور دارند و همگام با تکامل پاتوژن‌ها، تغییر می‌کنند تا توانایی دفاع از بدن در برابر انواع میکروب‌ها را داشته باشند. بنابراین از ایجاد سویه‌های پاتوژن جهش یافته‌ی مقاوم به ترکیبات ضدمیکروبی (که در صورت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها رخ می‌دهد) جلوگیری می‌کنند (Douglas، ۲۰۱۲؛ Katzenback، ۲۰۱۵). پپتیدهای ضدمیکروبی علاوه بر مقابله مستقیم باپاتوژن‌ها، در تحریک سیستم دفاعی میزبان، هدایت کردن سلول‌های ایمنی به سمت محل عفونت، و حتی تاحدودی در ایجاد پاسخ ایمنی اکتسابی نیز نقش دارند و البته این پپتیدها برای میکروارگانیزم‌های مفید بدن مضر نیستند (Brown و Hancock، ۲۰۰۶؛ Douglas، ۲۰۱۲). تاکنون گزارشی از مقاوم شدن پاتوژن‌ها در برابر پپتیدهای ضدمیکروبی ارائه نشده است و این امر پپتیدهای ضدمیکروبی را به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها در مصارف پزشکی و دامپزشکی مطرح می‌کند (Casadei، ۲۰۱۱؛ Katzenback، ۲۰۱۵). پپتیدهای ضدمیکروبی ماهیان را به‌خاطر طیف وسیع فعالیت ضد میکروبی و هم‌چنین پایین بودن فعالیت همولیتیکی و سمیت سلولی آن‌ها، می‌توان به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای استفاده به‌عنوان دارو در آبزی‌پروری دانست. از طرفی، به‌علت توانایی بالای این پپتیدها در مهار انواع باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها می‌توان از آن‌ها در نگه‌داری غذای ماهیان در صنعت آبزی‌پروری نیز استفاده نمود (Douglas، ۲۰۱۲). اخیراً مطالعاتی بر روی پتانسیل استفاده از این پپتیدها به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی برای درمان بیماری‌های ماهیان و هم‌چنین برای درمان بیماری‌های انسان صورت گرفته است (Masso-Silva و Diamond، ۲۰۱۴). عرصه دیگر کاربردی پپتیدهای ضدمیکروبی ماهیان، استفاده از آن‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده‌های مواد غذایی می‌باشد، چراکه در واقع این پپتیدها از منابع غذایی طبیعی به‌دست می‌آیند و بنابراین قابلیت مصرف توسط انسان را دارند (Burrowes و همکاران، ۲۰۰۴). هپسیدین‌ها گروهی از پپتیدهای غنی از سیستئین و دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشند. این پپتیدها اولین بار در انسان کشف شدند و از آن زمان تاکنون در بسیاری از مهره‌داران دیگر از جمله خزندگان، دوزیستان و ماهی‌ها نیز شناسایی شده‌اند. هپسیدین ماهیان برای اولین‌بار در ماهی باس راه راه هیبرید (Morone chrysops × Morone saxatilis) شناسایی شده است (Shike و همکاران، ۲۰۰۲) و از آن به بعد حداقل در ۳۷ گونه ماهی شناسایی شده است (Masso-Silva و Diamond، ۲۰۱۴). پپتیدهای هپسیدین در ماهیان علیه انواعی از پاتوژن‌ها ازجمله باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و هم‌چنین ویروس‌ها فعال هستند (Masso-Silva و Diamond، ۲۰۱۴). هم‌چنین گزارش شده است که پپتید TH-2-3 (هپسیدین ماهی تیلاپیا) در مهار تکثیر رده سلولی سرطانی فیبروسارکوما انسانی (HT1080) مؤثر می‌باشد و باعث تخریب غشای سلولی و ایجاد آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (Chen و همکاران، ۲۰۰۹). به‌علاوه، TH1-5 باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی (HeLa و HT1080) می‌شود (Chang و همکاران، ۲۰۱۱). از طرفی دیگر، هپسیدین ماهیان نقش تعدیل ایمنی (immunomodulatory) در ماهیان و هم‌چنین موش نیز دارد و باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی می‌شود (Pan و همکاران، ۲۰۱۱). مطالعات مختلف نشان داده است که پپتید ضدمیکروبی هپسیدین مکانیسم‌های مختلفی برای کنترل میکروب‌ها دارد (Katzenback، ۲۰۱۵). پپتیدهای کاتیونی مانند هپسیدین قادر به اتصال و تداخل با غشاهای سلولی باکتری، ویروس، قارچ و

انگل هستند که دارای بار منفی می‌باشند. بنابراین، هپسیدین با اتصال و تداخل با غشای خارجی باکتری می‌تواند منجر به تخریب آن و در نهایت از بین رفتن باکتری شود (Zhang و همکاران، ۲۰۱۴). از طرفی دیگر، هپسیدین از طریق تداخل با DNA باکتری و هیدرولیز آن نیز باعث از بین رفتن باکتری می‌شود (Álvarez و همکاران، ۲۰۱۴). به دلیل اهمیت فیزیولوژیکی هپسیدین، این پپتید یکی از پرمطالعه‌ترین پپتیدهای ضدمیکروبی در ماهیان می‌باشد. بیماری استرپتوکوکوزیس، یکی از بیماری‌هایی است که در سال‌های اخیر در مزارع پرورش آزادماهیان ایران، تلفات زیادی را به همراه داشته است. در جهان نیز این بیماری سالانه بیش از ۱۰۰ میلیون دلار خسارت اقتصادی در مزارع پرورش ماهی ایجاد می‌کند (Kooshkaki و همکاران، ۲۰۱۴). علائم ظاهری این بیماری شامل بی‌حالی و شنای نامنظم، خونریزی در قاعده باله، پرخونی و خون‌ریزی در اندام‌های داخلی مانند کلیه و طحال، بیرون زدگی چشم و تیرگی بدن (Soltani و همکاران، ۲۰۰۵). یکی از باکتری‌های مهم عامل این بیماری، باکتری *Streptococcus iniae* می‌باشد. این باکتری گرم- مثبت، یک پاتوژن مهم در ماهیان (به‌ویژه آزادماهیان) و انسان می‌باشد (Pérez-Ramos و همکاران، ۲۰۱۵). هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی قابلیت پپتید ضدمیکروبی هپسیدین ماهی آزاد دریای خزر که در مطالعات قبلی ما شناسایی و گزارش شد، بر کنترل بیماریزایی باکتری *Streptococcus iniae* و هم‌چنین ارزیابی توانایی این پپتید در تقویت سیستم ایمنی در شرایط درون‌تنی در ماهی آزاد دریای خزر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پپتید سنتتیک هپسیدین ماهی آزاد خزر: توالی کامل ژن کدکننده پپتیدضدمیکروبی هپسیدین ماهی آزاد دریای خزر (CtHep) توسط نویسندگان مقاله حاضر شناسایی و با کد دسترسی MK089523 در بانک ژن NCBI ثبت شد (Shirdel و همکاران، ۲۰۱۹). بخش بالغ پپتیدهپسیدین (QSHLSLCRWCCNCCHNKGCGFCCKF) ماهی آزاد خزر توسط شرکت Biomatik (اونتاریو، کانادا) به‌صورت شیمیایی و با خلوص ۹۸٪ سنتز شد. میزان خلوص پپتید سنتز شده با روش HPLC سنجش شد. ریفولدینگ پپتید خطی CtHep به‌آرامی با اکسیداسیون هوا (air oxidation) در DMSO به‌مدت یک‌شب در دمای اتاق انجام شد (Khemtemourian و همکاران، ۲۰۱۲). وزن مولکولی پپتید سنتز شده توسط طیف‌سنجی جرمی تایید شد (شکل ۱). طیف جرمی با استفاده از روش یونیزاسیون الکترواسپری (ESI) تهیه شد. این تکنیک موجب تولید یون‌های با بار مثبت ([M + nH]n+) می‌شود که با توجه به نسبت جرم به بار (m/z) تشخیص داده می‌شوند.



شکل ۱: آنالیز طیف‌سنجی جرمی پپتید سنتتیک CtHep. وزن مولکولی مورد انتظار ۲۸۷۳/۴۳ دالتون تأیید شد و نشان داد که تمام چهار پیوند دی‌سولفیدی در پپتید بالغ وجود دارد

آزمایش درون تنی (*in vivo*): آزمایش درون‌تنی به‌منظور بررسی اثر پپتید ضدمیکروبی CtHep در کنترل باکتری بیماریزای *Streptococcus iniae* در ماهی آزاد دریای خزر و هم‌چنین اثر آن بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی انجام شد. برای این منظور، ابتدا ۸۰ عدد بچه‌ماهی آزاد دریای خزر با میانگین وزنی ۳±۲۰ گرم از مزارع پرورش ماهی خصوصی خریداری و به سالن پرورش آزادماهیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل و در مخزن فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری حاوی آب شهری کلرزدایی و هوادهی شده نگه‌داری شدند. باکتری *S. iniae* مورد استفاده در این آزمایش از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران با کد دسترسی GQ850377 تهیه شد. قبل از شروع تیمارهای آزمایشی ماهی‌ها به‌مدت ۱ هفته به شرایط سالن پرورش سازگار شدند. ماهی‌ها روزانه به‌مقدار ۲٪ وزن بدن با غذای تجاری قزل‌آلا (تهیه شده از شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران) تغذیه شدند. بعد از گذراندن دوره سازگاری، ماهی‌ها به‌طور تصادفی به ۴ تیمار با دو تکرار در مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری (حاوی ۱۰۰ لیتر آب) دسته‌بندی شدند. ۱۰ عدد ماهی برای هر تکرار درنظر گرفته شد. تیمارهای آزمایشی به‌شرح زیر بوده‌اند:

شاهد (PBS): ماهیان سالم با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (PBS) تزریق شدند. در این تیمار، چلنج باکتری انجام نشد. پپتید (CtHep): ماهیان سالم با ۱۰۰ میکرولیتر پپتید CtHep (حل شده در PBS) که دارای غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، تزریق شدند (به‌ازای هر گرم ماهی، یک میکروگرم پپتید CtHep استفاده شد). در این تیمار، چلنج باکتری انجام نشد. باکتری (*S. iniae*): ماهیان سالم به‌مدت ۳۰ دقیقه در آب حاوی 10^6 کلنی در میلی‌لیتر از باکتری *S. iniae* غوطه‌ور شدند. پپتید+ باکتری (CtHep + *S. iniae*): ماهیان سالم ابتدا با ۱۰۰ میکرولیتر پپتید CtHep (حل شده در PBS) که دارای غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، تزریق شدند (به‌ازای هر گرم ماهی، یک میکروگرم پپتید CtHep استفاده شد). دو ساعت بعد از تزریق پپتید، ماهیان به‌مدت ۳۰ دقیقه در آب حاوی 10^6 کلنی در میلی‌لیتر از باکتری *S. iniae* غوطه‌ور شدند. در ادامه، ماهیان تیمارهای مختلف به مخازن‌های حاوی آب تمیز و شیرین منتقل شدند. طول کل دوره آزمایش ۱۰ روز بوده و آب موجود در مخازن هر ۲۴ ساعت به‌صورت کامل با آب تازه جایگزین شد. در طی این مدت، تغذیه ماهی‌ها روزانه به‌مقدار ۲-۱٪ وزن بدن انجام شد. تلفات روزانه ماهیان نیز به ثبت رسید. مقدار درصد زنده‌مانی نسبی (RPS= Relative Percent Survival) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

RPS = [(تعداد تلفات در ماهیان گروه شاهد/ تعداد تلفات در ماهیان تیمار شده با پپتید ضدمیکروبی)-۱]×۱۰۰

نمونه‌برداری: ۲۴ ساعت بعد از چلنج باکتری، تعداد ۶ عدد ماهی به‌طور تصادفی از هر تیمار (۳ عدد از هر تکرار) خارج شد. ماهی‌ها به‌وسیله پودر میخک با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در لیتر (ppm) بی‌هوش و سپس تشریح شدند. در ادامه، بافت‌های کلیه و طحال نمونه‌برداری شدند. نمونه‌ها برای سنجش بار باکتریایی کل، بلافاصله بعد از نمونه‌برداری مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های مورد نیاز برای سنجش بیان ژن بلافاصله بعد از تشریح در ازت مایع قرار داده شد و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد و تا زمان سنجش بیان ژن‌های TNF-α، IL-6 و IL-1β در آن نگه‌داری شد.

سنجش بار باکتریایی کل در بافت‌ها: مقدار ۰/۱ گرم از بافت‌های کلیه و طحال بلافاصله بعد از نمونه‌برداری به‌صورت جداگانه در ۹۰۰ میکرولیتر محلول سرم فیزیولوژی (۰/۹٪ NaCl) هموژن شد. سپس رقت‌های سریالی 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3} و 10^{-4} از آن تهیه شد. از هر یک از رقت‌های تهیه شده یک میلی‌لیتر برداشته شد و با روش pour plate بر روی محیط کشت plate count agar کشت داده شد. هر رقت با سه تکرار کشت داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند و سپس تعداد کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت، شمارش شد.

سنتز cDNA و سنجش میزان بیان ژن‌های TNF-α، IL-6 و IL-1β: نمونه‌های بافت‌های کلیه و طحال با استفاده از نیتروژن مایع هموژن شدند و استخراج RNA کل از آن‌ها با استفاده از محلول RNX-Plus (SinaClon BioScience, Tehran, Iran) و براساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به‌ترتیب با استفاده از ژل آگاروز ۱٪ و اسپکتروفوتومتر ارزیابی شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Suprime (GeNet Bio, South Korea) Script Rtase-Prime MMLV Reverse Transcriptase انجام شد. اندازه‌گیری بیان ژن‌های مذکور با استفاده از روش quantitative real-time PCR انجام شد. از ژن β-actin به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در real-time PCR در جدول ۱ ارائه شده است. qRT-PCR با استفاده از دستگاه Bio-Rad MyiQ™ Real-Time PCR Detection System در حجم کل ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر بافر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میکرومولار)، ۲/۸ میکرولیتر آب، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم پلیمراز *Taq* و ۵ میکرولیتر از cDNA رقیق‌شده، انجام شد. واکنش real-time PCR در ۴۰ چرخه (۹۴ درجه، ۱۵ ثانیه؛ ۶۰ درجه، ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه، ۳۰ ثانیه) انجام شد. سطوح بیان ژن‌های TNF-α، IL-6 و IL-1β با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. آزمایش با سه تکرار تکنیکی برای هر نمونه انجام شد.

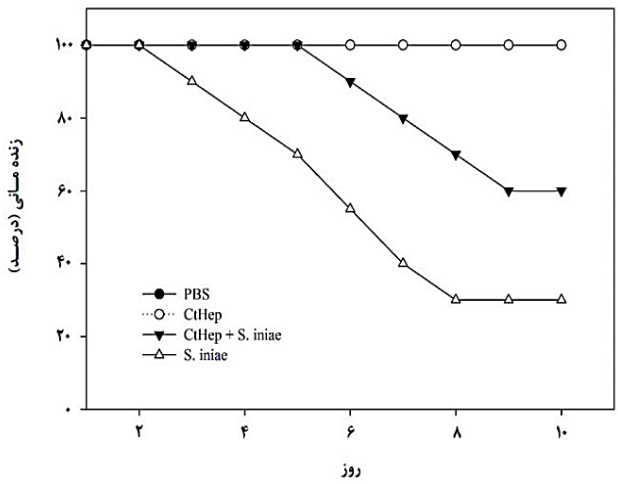
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

ژن	توالی (´۳→´۵)
IL-1β	**F:** ACATTGCCAACCTCATCATCG **R:** TTGAGCAGGTCCTTGTCCTTG
IL-6	**F:** GGAGGCATGTCTGCAGGAGA **R:** GTGACAGAGGGGAGTAGGGT
TNF-α	**F:** CAAGAGTTTGAACCTTGTTCAA **R:** GCTGCTGCCGCACATAGAC
β-actin (کنترل داخلی)	**F:** ATGGAAGGTGAAATCGCC **R:** TGCCAGATCTTCTCCATG

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای بررسی نرمال‌بودن داده‌ها از روش کولموگروف- اسمیرنوف استفاده شد. برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها در داده‌های حاصل از بیان ژن‌های TNF-α، IL-6 و IL-1β و هم‌چنین داده‌های حاصل از میزان بار باکتریایی کل در بافت‌ها، از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون دانکن استفاده شد. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SigmaPlot نسخه ۱۲ انجام گرفت.

نتایج

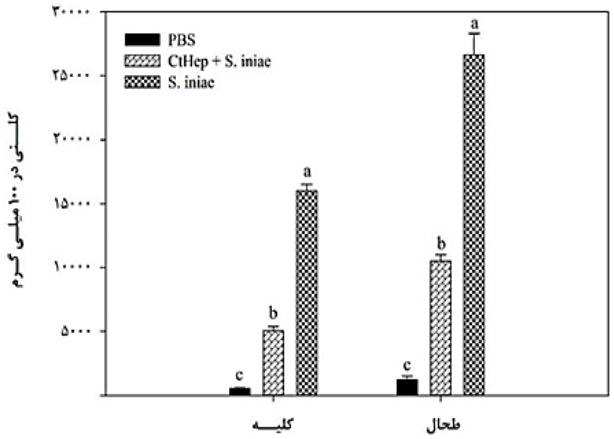
زنده‌مانی: در طول دوره ۱۰ روزه، میزان تلفات در ماهیان تزریق شده با پپتید سنتتیک CtHep به‌طور قابل توجهی کم‌تر از تلفات ماهیان تزریق شده با بافر فسفات (PBS) بوده است. مقدار درصد زنده‌مانی نسبی ۴۲/۸۶ درصد بوده است. ماهیان تیمارهای شاهد (تزریق ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و بدون چلنج باکتری) و تیمار پپتید (تزریق ۱۰۰ میکرولیتر پپتید و بدون چلنج باکتری) تلفاتی در طی دوره ۱۰ روزه نداشتند (شکل ۲).



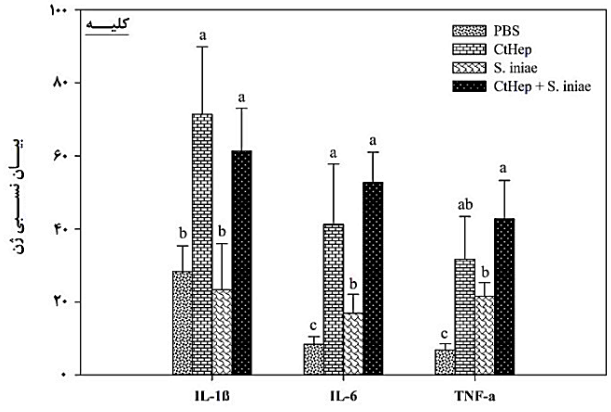
شکل ۲: میزان زنده‌مانی ماهی آزاد دریای خزر در پاسخ به تزریق پپتید و چالش باکتری *S. iniae*.

بار باکتریایی کل: مقدار بار باکتریایی کل در بافت‌های کلیه و طحال ماهی آزاد دریای خزر در تیمار "پپتید+باکتری" به‌طور معنی‌داری کم‌تر از میزان بار باکتریایی کل در تیمار "باکتری" بوده است (شکل ۳).

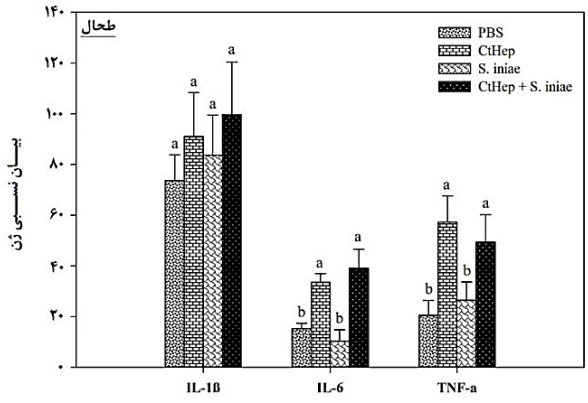
بیان ژن‌های سایتوکین: میزان بیان ژن‌های IL-6 و IL-1β در ماهیان تیمارهای "پپتید" و "پپتید+باکتری" در بافت کلیه نسبت به گروه‌های "شاهد" و "باکتری" افزایش یافت ($p<0/05$). بیان ژن TNF-α نیز در بافت کلیه در تیمارهای "پپتید" و "پپتید+باکتری" به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از بیان این ژن در کلیه ماهیان تیمار "شاهد" بوده است (شکل ۴). در بافت طحال، بیان ژن‌های TNF-α و IL-6 افزایش معنی‌داری در ماهیان تیمارهای "پپتید" و "پپتید+باکتری" نسبت به ماهیان گروه‌های "شاهد" و "باکتری" داشت (شکل ۵).



شکل ۳: میزان بار باکتریایی کل در بافت‌های کلیه و طحال ماهی آزاد دریای خزر در پاسخ به تزریق پپتید CtHep و چالش باکتری *S. iniae*.
حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف برای هر بافت می‌باشد ($p<0/05$).



شکل ۴: بیان ژن‌های TNF-α، IL-6 و IL-1β در بافت کلیه ماهی آزاد دریای خزر بعد از ۲۴ ساعت در پاسخ به تزریق پپتید CtHep و چالش باکتری *S. iniae*. گروه شاهد با بافر فسفات (PBS) به تنهایی تزریق شد (بدون چالش باکتری). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف برای هر ژن می‌باشد ($p<0/05$).



شکل ۵: بیان ژن‌های TNF-α، IL-6 و IL-1β در بافت طحال ماهی آزاد دریای خزر بعد از ۲۴ ساعت در پاسخ به تزریق پپتید CtHep و چالش باکتری *S. iniae*. گروه شاهد با بافر فسفات (PBS) به تنهایی تزریق شد (بدون چالش باکتری). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف برای هر ژن می‌باشد (p<۰/۰۵).

بحث

در مطالعه حاضر پپتید سنتتیک CtHep اثرات قابل توجهی بر ماهی آزاد دریای خزر در مواجهه با باکتری بیماریزای *S. iniae* داشته است. میزان زنده‌مانی در مواجهه با باکتری *S. iniae* در ماهیان تزریق شده با پپتید CtHep به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از ماهیان تزریق شده با PBS بوده است. میزان زنده‌مانی در ماهی گورخری (*Danio rerio*) تزریق شده با پپتید سنتتیک هپسیدین ماهی *Amatitlania nigrofasciata* (۰/۱ میکروگرم به‌ازای هر ماهی) در برابر باکتری‌های *S. agalactiae* و *Vibrio vulnificus* بعد از ۸ روز به‌ترتیب ۵۸ و ۴۲ درصد بود. در حالی‌که در گروه شاهد (تزریق شده با سرم فیزیولوژی)، تمامی ماهی‌ها در طول ۸ روز از بین رفتند (Chi و همکاران، ۲۰۱۵). Pan و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که زنده‌مانی موش آلوده شده با باکتری *V. vulnificus* در اثر تزریق پپتید سنتتیک هپسیدین (TH2-3) ماهی تیلاپیا در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است. آن‌ها اظهار کردند که‌افزایش زنده‌مانی در موش‌ها به‌خاطر خاصیت ضدمیکروبی، عملکرد واکسن‌گونه و همچنین عملکرد تنظیم ایمنی (immunomodulatory) پپتید هپسیدین میباشد. در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۸)، تزریق صفاقی ۱ میکروگرم در گرم پپتید سنتتیک هپسیدین-۲ ماهی *Bolephthalmus pectinirostris*، به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی ماهی در برابر باکتری *Edwardsiella tarda* را در زمان هفت روز بعد از آلوده شدن، افزایش‌داد. در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۱۷) پپتید هپسیدین نوترکیب ماهی *Trachidermus fasciatus*،میزان زنده‌مانی ماهی آلوده شده به باکتری *Vibrio anguillarum* را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. در مطالعه Ruenkoed و Wang (۲۰۱۹)، ماهی لوچ (*Misgurnus anguillicaudatus*) تزریق شده با هپسیدین نوترکیب، زنده‌مانی بسیار بالاتری در زمان هفت روز بعد از چلنج با باکتری *A. hydrophilla* نسبت به تیمار شاهد (تزریق شده با PBS) داشته است. به‌طوری‌که گروه تزریق شده با هپسیدین نوترکیب دارای تلفات ۲۰٪، و تیمار شاهد دارای تلفات ۷۳٪ بوده است. مطالعه حاضر نیز در مطابقت با تحقیقات پیشین می‌باشد و پپتید سنتتیک CtHep، اگرچه به‌طور کامل تلفات ناشی از باکتری *S. iniae* در ماهی آزاد دریای خزر را کاهش نداد، اما تاثیر قابل توجهی بر زنده‌مانی این ماهی در برابر عفونت باکتری *S. iniae* داشته است. در نتایج مطالعه حاضر مشخص شد که ایجاد تلفات در گروه تزریق شده با پپتید CtHep در مقایسه با گروه شاهد، با چند روز تاخیر آغاز شده است. بنابراین احتمالاً استفاده از این پپتید در چند مرحله در طی عفونت باکتری *S. iniae* می‌تواند اثرات به‌مراتب بیش‌تری در حفظ سلامت ماهیان در برابر این باکتری داشته باشد. یکی دیگر از دلایل افزایش زنده‌مانی ماهی تزریق شده با پپتید هپسیدین در برابر عفونت باکتریایی می‌تواند افزایش بیان ژن‌های سایتوکین و در نتیجه افزایش ایمنی ماهی باشد که با رشد باکتری در ماهی آلوده شده مقابله می‌کند.

ماهیان Turbot (*Scophthalmus maximus*) تزریق شده با پپتیدهای سنتتیک هپسیدین-۱ (SmHep1P) و هپسیدین-۲ (SmHep2P) به‌طور معنی‌داری مقدار باکتریایی کم‌تری در بافت‌های کبد، کلیه و طحال در روزهای اول و دوم بعد از آلوده شدن با باکتری *E. tarda* در مقایسه با تیمار شاهد (تزریق با PBS) داشتند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۴). مقدار بار باکتریایی کل در ماهی گورخری (*D. rerio*) و سیچلاید زندانی (*Archocentrus nigrofasciatus*) ترانس‌ژن شده با ژن هپسیدین (TH2-3) ماهی تیلاپیا در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق باکتری *V. vulnificus* به‌طور معنی‌داری در مقایسه با ماهی ترانس‌ژن نشده (wildtype)، کاهش یافت (Hsieh و همکاران، ۲۰۱۰). میزان بار باکتریایی کل در بافت‌های کلیه، طحال و کبد ماهی *B. pectinirostris* تزریق شده با پپتید سنتتیک هپسیدین-۲ (یک میکروگرم در گرم)، به‌طور معنی‌داری ۲۴ ساعت بعد از آلوده شدن به باکتری *E. tarda* درمقایسه با گروه شاهد (تزریق نمک) کاهش یافت (Chen و همکاران، ۲۰۱۸). در مطالعه حاضر نیز مقدار بار باکتریایی کل در بافت‌های کلیه و طحال ۲۴ ساعت بعد از چلنج با باکتری *S. iniae* در ماهی آزاد تزریق شده با پپتید سنتتیک CtHep به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار "باکتری" (چلنج داده شده با باکتری *S. iniae* و بدون تزریق پپتید CtHep)، کاهش یافت. این کاهش ممکن است به‌خاطر خاصیت باکتریایی پپتید CtHep علیه باکتری *S. iniae* باشد که در

مطالعات قبلی نیز به اثبات رسیده است. هم‌چنین کاهش رشد باکتری در ماهی آلوده‌شده، می‌تواند به‌خاطر اثرات بازدارندگی ناشی از افزایش بیان ژن‌های سایتوکین TNF-α، IL-6 و IL-1β در بافت‌های کلیه و طحال ماهی آزاد تزریق شده با پپتید CtHep باشد. Álvarez و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که پپتید سنتتیک هپسیدین قزل آلای رنگین‌کمان می‌تواند از غشای‌سلولی باکتری عبور کند و از طریق هیدرولیز DNA ژنومی باکتری‌ها، باعث کشته شدن باکتری شود. در مطالعه حاضر نیز احتمالاً پپتید ضدمیکروبی CtHep از همین طریق توانسته است باکتری *S. iniae* را مهار کند و بار باکتریایی بافت‌ها را کاهش دهد.

سایتوکین‌ها توسط ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها ترشح می‌شوند و در پاسخ به عفونت نقش دارند (Zhang و An، ۲۰۰۷). نتایج نشان داد که هپسیدین ماهی آزاد دریای خزر اثر تنظیم‌کنندگی بر روی بیان ژن‌های سایتوکین IL-1β، IL-6 و TNF-α دارد. مطالعات بسیار کمی در مورد اثرات تعدیل ایمنی پپتید هپسیدین در شرایط درون‌تنی درماهیان وجود دارد. Chi و همکاران(۲۰۱۵) گزارش کردند که تزریق پپتید هپسیدین سنتتیک ماهی سیچلاید زندانی (*A. nigrofasciata*) به ماهی گورخری باعث افزایش بیان ژن‌های IL-1β، IL-6، IL-15 و TNF-α و هم‌چنین افزایش زنده‌مانی آن در برابر باکتری‌های *S. agalactiae* و *V. vulnificus* شده است. Pan و همکاران(۲۰۱۱)افزایش‌بیان‌ژن‌سایتوکین TNF-α در ماهی گورخری ترانس‌ژن شده با پپتید هپسیدین ۵-۱ ماهی تیلاپیا (TH1-5) نسبت به ماهی گورخری ترانس‌ژن نشده (wildtype) را گزارش کردند، در صورتی‌که IL-1β تغییر معنی‌داری نداشته است.آن‌ها هم‌چنین مشاهده کردند که در ماهیان ترانس‌ژن شده که با باکتری *V. vulnificus* آلوده شدند، میزان بیان ژن‌های IL-1β و TNF-α در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق باکتری نسبت به گروه شاهد (ماهی wildtype تزریق شده با PBS) و ماهی wildtype تزریق شده با باکتری *V. vulnificus*، افزایش معنی‌داری یافت. در مطالعه Hsieh و همکاران (۲۰۱۰) مقدار بیان ژن سایتوکین TNF-α در ماهی گورخری ترانس‌ژن شده با پپتید هپسیدین ۳-۲ ماهی تیلاپیا (TH2-3) در مقایسه با ماهی گورخری ترانس‌ژن نشده (wildtype) افزایش معنی‌داری داشت. مطالعه حاضر نشان داد که پپتید سنتتیک CtHep از طریق افزایش بیان ژن‌های سایتوکین شامل IL-1β، IL-6 و TNF-α در کلیه و طحال موجب تقویت سیستم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر می‌شود که در مواجهه با پاتوژن‌ها می‌تواند به حفظ سلامت و زنده‌مانی ماهی کمک کند.

پپتید ضدمیکروبی هپسیدین ماهی آزاد دریای خزر، علاوه بر اثرات ضدمیکروبی در برابر باکتری بیماریزای آزادماهیان (*S. iniae*) که منجر به کاهش بار باکتریایی بافت‌ها و هم‌چنین افزایش زنده‌مانی ماهی شده است، توانست نقش قابل توجهی در تقویت سیستم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر از طریق افزایش بیان ژن‌های سایتوکین داشته باشد. بنابراین پپتید ضدمیکروبی هپسیدین ماهی آزاد دریای خزر می‌تواند هم به‌عنوان عامل ضدمیکروبی و هم به‌عنوان محرک ایمنی در صنعت آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱. **Álvarez, C.A.; Guzmán, F.; Cárdenas, C.; Marshall, S.H. and Mercado, L., 2014.** Antimicrobial activity of trout hepcidin. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 41, No. 1, pp: 93-101.

۲. **Aoki, W.; Kuroda, K. and Ueda, M., 2012.** Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 114, pp: 365-370.

۳. **Brogden, K.A.; Ackermann, M.; McCray, P.B. and Tack, B.F., 2003.** Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. International Journal of Antimicrobial Agents. Vol. 22, pp: 465-478.

۴. **Brown, K.L. and Hancock, R.E., 2006.** Cationic host defense (antimicrobial) peptides. Current Opinion in Immunology. Vol. 18, No. 1, pp: 24-30.

۵. **Burrowes, O.J.; Hadjicharalambous, C.; Diamond, G. and LEE, T.C., 2004.** Evaluation of antimicrobial spectrum and cytotoxic activity of pleurocidin for food applications. Journal of Food Science. Vol. 69, No. 3, pp: 66-۷۱.

۶. **Casadei, E., 2011.** The effect of dietary immunostimulation on antimicrobial peptide expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their potential role in defense against pathogens. Doctoral thesis. University of Aberdeen. 266 p.

۷. **Chang, W.T.; Pan, C.Y.; Rajanbabu, V.; Cheng, C.W. and Chen, J.Y., 2011.** Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) antimicrobial peptide, hepcidin 1–5, shows antitumor activity in cancer cells. Peptides. Vol. 32, pp: 342-352.

۸. **Chen, J.Y.; Lin, W.J. and Lin, T.L., 2009.** A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells. Peptides. Vol. 30, No. 9, pp: 1636-1642.

۹. **Chen, J.; Nie, L. and Chen, J., 2018.** Mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) hepcidin-1 and hepcidin-2 present different gene expression profile and antibacterial activity and possess distinct protective effect against Edwardsiella tarda infection. Probiotics and Antimicrobial Proteins. Vol. 10, No. 2, pp: 176-185.

۱۰. **Chi, J.R.; Liao, L.S.; Wang, R.G.; Jhu, C.S.; Wu, J.L. and Hu, S.Y., 2015.** Molecular cloning and functional characterization of the hepcidin gene from the convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*) and its expression pattern in response to lipopolysaccharide challenge. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 41, No. 2, pp: 449-461.

۱۱. **Douglas, S.E., 2012.** Antimicrobial Peptides and Their Potential as Therapeutants in Aquaculture. *In*: Aquaculture Biotechnology. Edited by GL Fletcher and ML Rise. John Wiley and Sons. pp: 105-120.

۱۲. **Hancock, R.E. and Lehrer, R., 1998.** Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends in Biotechnology. Vol. 16, pp: 82-88.

۱۳. **Hsieh, J.C.; Pan, C.Y. and Chen, J.Y., 2010.** Tilapia hepcidin (TH) 2-3 as a transgene in transgenic fish enhances

resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 29, No. 3, pp: 430-439.

۱۴. **Ingham, A.B. and Moore, R.J., 2007.** Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. Biotechnology and Applied Biochemistry. Vol. 47, No. 1, pp: 1-9.

۱۵. **Katzenback, B.A., 2015.** Antimicrobial Peptides as Mediators of Innate Immunity in Teleosts. Biology. Vol. 4, No. 4, pp: 607-639.

۱۶. **Khemtemourian, L.; Desbenoit, N.; Mahesh, P.; Chatterjee, S.; Deschemin, J.C.; Vaulont, S.; Tomas, A.; Sari, M.A. and Artaud, I., 2012.** Synthesis and biological activity of mouse hepcidin peptide analogs containing three disulfide bridges: manual and microwave-assisted solid phase peptide synthesis. Protein and Peptide Letters. Vol. 19, pp: 219-227.

۱۷. **Kooshkaki, M.R.; Bandehpour, M. and Kazemi, B., 2014.** The design of the constructs of cpsD and simA genes of *Streptococcus iniae*. Novelty in Biomedicine. Vol. 2, No. 1, pp: 1-5.

۱۸. **Liu, Y.; Han, X.; Chen, X.; Yu, S.; Chai, Y.; Zhai, T. and Zhu, Q., 2017.** Molecular characterization and functional analysis of the hepcidin gene from roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 68, pp: 349-358.

۱۹. **Masso-Silva, J.A. and Diamond G., 2014.** Antimicrobial peptides from fish. Pharmaceuticals. Vol. 7, No. 3, pp: 265-310.

۲۰. **Pan, C.Y.; Huang, T.C.; Wang, Y.D.; Yeh, Y.C.; Hui, C.F. and Chen, J.Y., 2012.** Oral administration of recombinant epinecidin-1 protected grouper (*Epinephelus coioides*) and zebrafish (*Danio rerio*) from *Vibrio vulnificus* infection and enhanced immune-related gene expressions. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 32, No. 6, pp: 947-957.

۲۱. **Pan, C.Y.; Peng, K.C.; Lin, C.H. and Chen, J.Y., 2011.** Transgenic expression of tilapia hepcidin 1-5 and shrimp chelonianin in zebrafish and their resistance to bacterial pathogens. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 31, No. 2, pp: 275-285.

۲۲. **Pérez-Ramos, A.; Nácher-Vázquez, M.; Notararigo, S.; López, P. and Mohedano, M.L., 2015.** Current and Future Applications of Bacterial Extracellular Polysaccharides. In: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Edited by VR Preedy and RR Watson. Elsevier Oxford, UK. pp: 329-344.

۲۳. **Ruenkoed, S. and Wang, W., 2019.** Cloning, characterization, antibacterial activity and expression of hamp in pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) after bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. Vol. 499, pp: 61-71.

۲۴. **Shike, H.; Lauth, X.; Westerman, M.E.; Ostland, V.E.; Carlberg, J.M.; Van Olst, J.C.; Shimizu, C.; Bulet, P. and Burns, J.C., 2002.** Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. European Journal of Biochemistry. Vol. 269, No. 8, pp: 2232-2237.

۲۵. **Shirdel, I.; Kalbassi, M.R.; Hosseinkhani, S.; Paknejad, H. and Wink, M., 2019.** Cloning, characterization and tissue-specific expression of the antimicrobial peptide hepcidin from Caspian trout (*Salmo caspius*) and the antibacterial activity of the synthetic peptide. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 90, pp: 288-296.

۲۶. **Soltani, M.; Jamshidi, S. and Sharifpour, I., 2005.** Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. Vol. 25, No. 3, pp: 95-106.

۲۷. **Zhang, J.; Yu, L.P.; Li, M.F. and Sun, L., 2014.** Turbot (*Scophthalmus maximus*) hepcidin-1 and hepcidin-2 possess antimicrobial activity and promote resistance against bacterial and viral infection. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 38, No. 1, pp: 127-134.

۲۸. **Zhang, J.M. and An, J., 2007.** Cytokines, inflammation and pain. International Anesthesiology Clinics. Vol. 45, No. 2, pp: 27-37.