مقایسه برخی پارامترهای ایمنی غیراختصاصی موکوس پوست گاوماهی زرد و گاوماهی خالدار

- **مرجان حسینی***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **حامد کلنگی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **حامد آزادی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **امید امیری**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥

تاریخ دریافت: تیر ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: مهر ١٣٩٦

چکیده

تحقیق حاضر با هدف مقایسه پارامتر های ایمنی موکوس پوست گاوماهی زرد (*Neogobius pallasi*) و گاوماهی خالدار (*Neogobius melanostomus*) انجام شد. از تعداد ۱۰ عدد ماهی به‌ترتیب ۵ عدد از هر گونه نمونه‌برداری موکوس صورت گرفته و فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی شامل: پروتئین محلول، لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز قلیایی و ایمنوگلوبولین کل موکوس دو گونه اندازه‌گیری شد. پس از پایان آزمایش مشخص شد که میزان پروتئین محلول (به‌ترتیب ۰/۲۲±۳/۱٤ و ۰/۳۲±۱/۲۳)، ایمنوگلوبولین کل (به‌ترتیب ۰/۰۲±۰/٤۸ و ۰/۱۲±۱/۰۹)، آلکالین فسفاتاز (به‌ترتیب ۰/۸۹±٤۱/۱۹ و ۱/۵۲±۳۰/۸۸) و مقدار لیزوزیم (به‌ترتیب ۱/۰۰±۱۰/٦۰ و ۰/٦۷±۸/۸۷) بود. اختلاف معنی‌داری بین سایر پارامترهای اندازه‌گیری شده در دو گونه وجود داشت (P<۰/۰۵) و به‌طورکلی میزان این پارامترها در گاوماهی زرد بالاتر از گاوماهی خالدار بود. در مجموع با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت موکوس می‌تواند نقش مهمی در ایمنی غیراختصاصی داشته باشد و تفاوت‌های دو گونه در مورد واکنش به شرایط استرس‌زا را می‌توان تا حدودی به پارامترهای ایمنی غیراختصاصی موکوسی نسبت داد.

کلمات کلیدی: موکوس، لیزوزم، آلکالین فسفاتاز قلیایی، ایمونوگلبولین

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: marjanhoseini1370@gmail.com

مقدمه

سیستم ایمنی در ماهیان همانند سایر مهره‌داران شامل سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی است. در جانوران آبزی سیستم ایمنی ذاتی نقش مهمی در حفاظت در مقابل پاتوژن‌ها دارد (Whyte، ۲۰۰۷) و شامل ترکیباتی از قبیل موکوس است که به‌عنوان یک سد حفاظتی عمل می‌کند (Magnadotir، ۲۰۰۶). سطح خارجی بدن ماهیان با لایه‌ای از موکوس پوشیده شده‌است که از سلول‌های ویژه‌ای به‌نام گابلت ترشح می‌شود این سلول‌ها در قسمت اپیدرمی پوست قرار گرفته‌اند (Clark و همکاران، ۱۹۹۴؛ Harris و همکاران، ۱۹۷۳). موکوس عمدتاً از آب و ماکروملکول‌های ژله مانندی از قبیل موسین و دیگر گلیکوپروتئین‌ها تشکیل شده‌است. گلیکوپروتئین‌های موکوس مقادیر زیادی الیگوساکارید دارند و یک لایه غیرقابل نفوذ در برابر آب روی لایه اپیتلیال تشکیل می‌دهند (Abraham، ۱۹۹۹). لایه موکوس موجود در سطح بدن ماهیان دارای نقش‌های متعددی ازقبیل: مقاومت در برابر بیماری‌ها، تنفس، تنظیمات یونی و اسمزی، تولیدمثل، تغذیه و لانه‌سازی است (Shephard، ۱۹۹۳؛ Negus، ۱۹۶۳). فعالیت ضدمیکروبی موکوس در مقابل انواع گوناگونی از پاتوژن‌ها توسط Hellio و همکاران (۲۰۰۲) گزارش شده‌است. فعالیت ضدمیکروبی ناشی از عملکردهای مکانیکی و بیوشیمیایی موکوس است. لایه موکوس به‌طور مداوم در حال جایگزین شدن است که این ویژگی مانع از استقرار و ایجاد کلنی توسط عوامل بیماری‌زا می‌شود (Pickering، ۱۹۷۴). موکوس حاوی ترکیبات بیولوژیکی فعالی از جمله لیزوزیم، لکتین، آنزیم‌های پروتئولیتیکی، ایمونوگلوبولین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی است که وظیفه این ترکیبات حفاظت از ماهیان در مقابل پاتوژن‌ها است (Alexander و Ingram، ۱۹۹۲؛ Villaroel و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kitani و همکاران، ۲۰۰۸). موکوس هم‌چنین دارای پروتئازهای مختلفی است که نقش مهمی در ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند. پروتئازها می‌توانند پروتئین‌های باکتری‌ها را شکسته سپس به‌صورت مستقیم به آن‌ها آسیب رسانند هم‌چنین اثر غیرمستقیم آن‌ها از طریق فعال کردن و اقزایش تولید کمپلمان، ایمونوگلوبولین و پروتئین‌های ضدمیکروبی است (Ingram، ۱۹۸۰). چگونگی حضور آنزیم‌هایی نظیر لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز قلیایی و پروتئازها هنوز به صورت کامل مشخص نیست اما دو فرضیه وجود دارد: ۱- آنزیم‌ها از طریق لایه اپیدرمی درون موکوس ترشح می‌شوند. ۲- از سرم و سلول‌های بافت هدف منتقل شده و در موکوس منتشر می‌شوند (Iger و Abraham، ۱۹۹۴). ترکیب، ویسکوزیته و میزان ترشح موکوس از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است و به عواملی ازجمله در معرض پارازیت‌ها قرار گرفتن و اختلالات موجود در محیط زیست مثل فشار اسمزی بالا و اسیدیته بستگی دارد (Agarwa و همکاران، ۱۹۹۷). لیزوزیم یک آنزیم ضدباکتریایی است که از طریق شکستن دیواره پپتیدوگلیکانی باکتری‌ها باعث مرگ آن‌ها می‌شود و به‌صورت غیراختصاصی مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود (Choi و همکاران، ۲۰۰۸). آنزیم فسفاتاز قلیایی یک آنزیم لیزوزمی است که بیش‌ترین دامنه فعالیت آن در پی‌اچ قلیایی است و در مرحله اول بهبود زخم و شرایط استرس‌زا از سلول‌های اپیدرمی ترشح می‌شود و دارای نقش حفاظتی درمقابل پاتوژن‌ها است (Iger و Abraham، ۱۹۹۸). پروتئین‌های ساختاری موکوس گلیکوپروتئین‌هایی با حجم ملکولی زیاد هستند که موسین‌ها نامیده می‌شوند (Tabak، ۱۹۹۵). هم‌چنین سلول‌هایی موسوم به سلول‌های کیسه‌ای شکل در اپیدرم ماهیان پروتئین‌ها را ترشح می‌نمایند که ماهیان را در برابر عفونت‌ها و آسیب‌های ناشی از انگل‌های خارجی حفظ می‌کنند. Suzuki و همکاران (۲۰۰۳)؛ Dhotre و همکاران (۲۰۱۳)؛ Timalata و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی و مقایسه پارامترهای ایمنی موکوس پوست بین گونه‌های مختلف پرداختند. مطالعات انجام شده در ارتباط با نقش ضدباکتریایی موکوس پوست در ماهیان محدود است بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی خواص ضدباکتریایی طیف وسیع‌تری از گونه‌های ماهی و هم‌چنین کسب یک دانش بنیادی از میزان اختلافات درون گونه‌ای پارامترهای موکوس اپیدرمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و استخراج موکوس: نمونه‌برداری در اردیبهشت ماه در جزیره آشوراده انجام شد. در این تحقیق از سطح پشتی تعداد ۱۰ عدد گاوماهی خالدار و باله زرد هم اندازه و هم جنس (نر) (هر کدام ۵ عدد) به‌وسیله لام یا قاشقک پلاستیکی استریل براساس روش Ross و همکاران (۲۰۰۰) موکوس جمع‌آوری شد. باید دقت شود که به‌دلیل احتمال آلودگی روده‌ای و اسپرمی موکوس نباید از سطح شکمی جمع‌آوری شود . موکوس جمع‌آوری شده به‌سرعت فریز شد و برای تحقیقات بیش‌تر به یخچال منفی ۸۰ منتقل گردید.

ارزیابی الگوی پروتئین: موکوس فریز شده جهت ارزیابی الگوی پروتئینی به دستگاه فریز درایر منتقل شد تا لیوفلایز گردد -SDS PAGE براساس روش Laemmli (۱۹۷۰) انجام شد. به این صورت که ۱۰ میلی‌گرم از موکوس لیوفلایز شده با ۲۰۰ میکرولیتر از بافر نمونه به‌خوبی هموژنایز شد، سپس به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت و در نهایت سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری گردید و بر روی ژل PAGE SDS (ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۷ درصد) لود و آنالیز شد.

سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم: اندازه‌گیری لیزوزیم براساس روش کدورت سنجی که به‌وسیله Shugar (۲۰۰۰) ارائه شده صورت گرفت. ۵۰ میکرولیتر از موکوس با بافر فسفات سدیم ۴۰ میلی‌مولار (pH=۶/۵) مخلوط شد و به پلیت ۹۶ خانه منتقل شده و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوباسیون شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی باکتری میکروکوکوس لوتئوس (۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باکتری در بافر فسفات سدیم ۴۰ میلی‌مولار، pH=۶/۵) به آن اضافه شد و جذب آن‌ها طی ۵۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه خوانش شد.

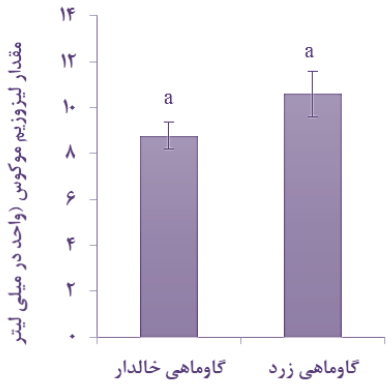
اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین کل: جهت اندازه‌گیری توتال ایمونوگلبولین از روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) استفاده شد. ابتدا میزان پروتئین سرم تعیین شده و سپس به نمونه موکوس، پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲ درصد اضافه شد. پس از ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفوژ شده و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً توسط روش بردفورد اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلایکول محاسبه خواهد شد.

سنجش میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی: برای اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش Lowry و همکاران (۲۰۰۵) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده شد. اندازه‌گیری با اضافه کردن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو به ۱۱ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده موکوس و استاندارد و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. با انتقال جذب نوری به‌دست آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس با استفاده از کیت‌های تولید شده توسط شرکت پارس و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر و اختلاف جذب نوری در مدت ۳ دقیقه تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم افزار Spss۲۲ و همچنین آزمون آماری دانکن با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد.

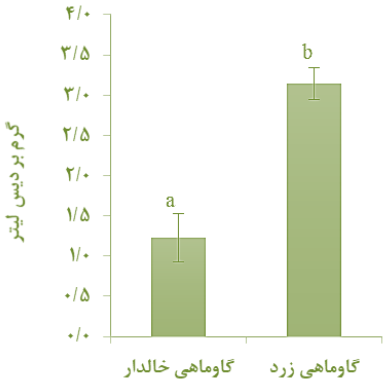
نتایج

نتایج حاصل از اندازه‌گیری لیزوزیم، پروتئین محلول، آلکالین فسفاتاز قلیایی و ایمونوگلبولین در شکل‌های ۱ تا ۴ آمده است. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم و آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی در گاوماهی زرد و گاوماهی خالدار اختلاف معنی‌داری باهم ندارند (P>۰/۰۵). اما میزان فعالیت این دو آنزیم در گاوماهی زرد بیش‌تر است. هم‌چنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین محلول در این دو گونه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میزان پروتئین محلول گاوماهی زرد و خالدار وجود دارد (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که پروتئین محلول در گاوماهی زرد بیش‌تر است اما میزان ایمونوگلبولین موجود در گاوماهی خالدار به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گاوماهی زرد است (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از SDS-PAGE در شکل ۵ آمده است. نتایج نشان داد که تراکم باندهای پروتئینی در در محدوده ۲۵ تا ۱۳۵ کیلودالتون در گاوماهی زرد بیش‌تر از گاوماهی خالدار است اما تراکم باندهای پروتئینی در محدوده ۱۱ تا ۱۷ کیلو دالتون در گاوماهی خالدار بیش‌تر است. اگرچه اختلافی بین تعداد باندها در این دو گونه مشاهده نشد.



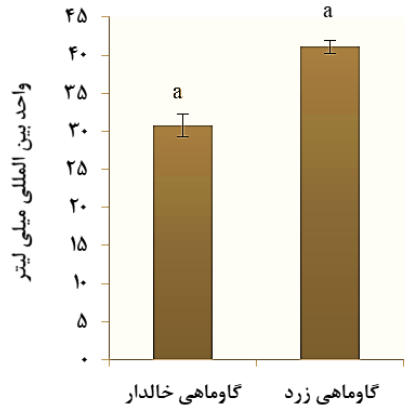
شکل ۱: نمودار مقایسه میزان لیزوزیم موکوس پوست گاوماهی زرد و خالدار

(حروف معنی‌داری نشان‌دهنده اختلاف در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد)



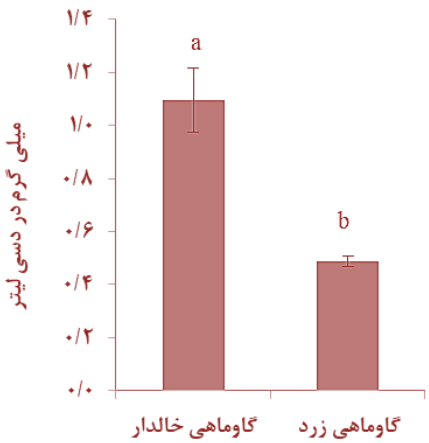
شکل ۲: نمودار مقایسه میزان پروتئین محلول موکوس پوست گاوماهی زرد و خالدار

(حروف معنی‌داری نشان‌دهنده اختلاف در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد)



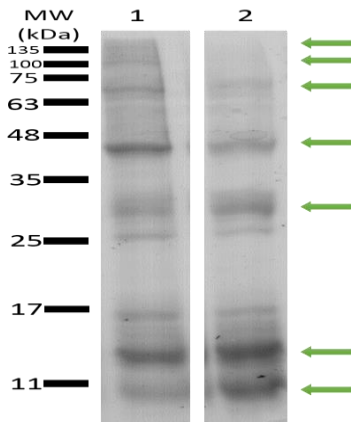
شکل ۳: نمودار مقایسه میزان آلکالین فسفاتاز موکوس پوست گاوماهی زرد و خالدار

(حروف معنی‌داری نشان‌دهنده اختلاف در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد)



شکل ۴: نمودار مقایسه میزان ایمونوگلبولین موکوس پوست گاوماهی زرد و خالدار

(حروف معنی‌داری نشان‌دهنده اختلاف در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد)



شکل۵: نتایج حاصل از الگوی پروتئینی گاوماهی زرد و گاوماهی خالدار (۱- گاوماهی زرد) و (۲- گاوماهی خالدار)

بحث

ماهیان به‌طور مداوم در ارتباط با محیط زیست آبی خود هستند که این محیط سرشار از میکرو ارگانیسم‌های غیربیماری‌زا و بیماری‌زا است. موکوس به‌عنوان یک سد بیولوژیکی میان ماهیان و عوامل بیماری‌زای محیط‌شان قرار گرفته است (Shephard، ۱۹۹۳)و به‌عنوان جزئی از مکانیسم ایمنی ذاتی پیوسته در حال جایگزین شدن است هم‌چنین منبع مهمی از اجزای دخیل در سیستم ایمنی غیراختصاصی ازجمله: لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های کمپلمان، لکتین، آنزیم‌های پروتئولیتیک و دیگر پروتئین‌ها و لیپیدهای آنتی‌باکتریال است (Subramanian و همکاران، ۲۰۰۷). کمیت وکیفیت ترکیبات موجود در موکوس در انواع گونه‌های ماهی متفاوت است و به عواملی از قبیل فاکتورهای ژنتیکی گونه، سن، غذا، شرایط محیط زیست و وجود یا عدم وجود عوامل استرس‌زا هنگام نمونه‌برداری موکوس بستگی دارد. تنوع در مقدار موکوس ترشح شده بر سطح پوست سبب ایجاد اختلاف در مقاومت گونه‌ها در مقابل پاتوژن‌ها می‌شود (Subramanian و همکاران، ۲۰۰۸). لیزوزیم یک آنزیم ضدباکتریایی قوی در سیستم ایمنی غیراختصاصی است که علاوه بر باکتری‌های گرم مثبت باعث لیز شدن باکتری‌های گرم منفی نیز می‌شود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان آنزیم لیزوزیم، نشان داد که فعالیت این آنزیم در گاو ماهی زرد بیش‌تر از گاو ماهی خالدار است. تنوع در میزان فعالیت این آنزیم می‌تواند به‌دلیل عواملی ازجمله پاسخ به استرس، دستکاری، بلوغ، غذا، جنسیت، تنوع گونه‌ای و تنوع ژنتیکی باشد (Subramanian و همکاران، ۲۰۰۷). Jong و همکاران (۲۰۱۲) پارامترهای بیوشمیایی موکوس ازجمله فعالیت لیزوزیم اپیدرم را درکفشک ماهی در ماه‌های مختلف و شرایط دمایی متفاوت مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد که فعالیت این آنزیم در ماه‌های مختلف بدون تغییر در بالاترین سطح خود قرار داشت. نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی به‌عنوان یک شاخص استرس در پاسخ به شرایط استرس‌زا مانند اسیدیته، افزایش دما و آلودگی آب نشان داد میزان فعالیت این آنزیم در گاوماهی زرد بیش‌تر از گاوماهی خالدار است این تفاوت‌ها به، محیطی که ماهی در آن تکامل پیدا می‌کند، ضخامت لایه اپیدرمیس و تعداد سلول‌های تولیدکننده موکوس، مربوط می‌شود (Fast و همکاران، ۲۰۰۲). وجود اختلافات قابل توجه در فعالیت آنزیم‌های هیدرولیکی از قبیل لیزوزیم، الکالین فسفاتاز، کاتپسین B و پروتئازها در گونه‌های مختلف ماهی و حتی گونه‌های متعلق به یک خانواده مشاهده شده است (Sangeetha و همکاران، ۲۰۰۷). سلول‌های کیسه‌ای شکل موجود در اپیدرم ماهیان پروتئین‌هایی را ترشح می‌کنند که ماهیان را در برابر عفونت‌ها

و آسیب‌های ناشی از انگل‌های خارجی حفظ می‌کنند (Suzuki و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری پروتئین محلول نشان داد که میزان این فاکتور در گاوماهی زرد بیش‌تر از گاوماهی خالدار است. گزارشات‌متعددی درارتباط با اندازه‌گیری میزان پروتئین در ماهیان وجود دارد. Timalata و همکاران (۲۰۱۵) با اندازه‌گیری پروتئین‌محلول ۵گونه‌ماهی‌متعلق به آب‌شیرین *Clarias gariepinus, Channa micropeletes, C. straitus, Oreochromis niloticus* *Hemibagrus nemurus* گزارش کردند که این ترکیب عمده‌ترین ترکیب در این گونه‌ها می‌باشد. حضور پروتئین در اپیدرم موکوس گونه‌های *Gaint snakehead, striped snakehead, Tilapia mossambicus, bagrid catfish* نیز به‌اثبات رسیده است (Rao و همکاران، ۲۰۱۵). Fagan و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی ترکیبات بیوشیمیایی موکوس ماهی آزاد اقیانوس اطلس در طول مدت تبدیل پار به اسمولت افزایش معنی‌داری در مقدار پروتئین محلول مشاهده کردند. نتایج به‌دست آمده از مقایسه فعالیت آنزیم‌های لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز قلیایی و پروتئین محلول در گونه‌های Arctic char, Brook trout, Koi carp, Striped bass, Atlantic cod و Hage fish نشان داد که ماهی کوی دارای بالاترین سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی است و تفاوت‌های زیادی بین فعالیت‌های آنزیمی در این هفت گونه و حتی گونه‌های متعلق به یک خانواده مثل Cod و Haddock از خانواده Gadidae و Arctic char و Brook trout از خانواده Salmonidae وجود داشت اما این امر که وجود این اختلافات ناشی از تکامل یا سازگاری ژنتیکی این گونه‌ها به فاکتورهای محیط زیستی است هنوز مشخص نیست (Sangeetha و همکاران، ۲۰۰۷). Edward و Twomey (۱۹۸۲) بیان کردند که میزان کاتپسین B نسبت به پروتئازها در ماهی کوی که یکی از واریته‌های کپور معمولی است نسبت به گونه‌های بالا، بسیار بیش‌تر است این ماهی متعلق به آب‌های ساحلی گلی می‌باشد بنابراین زیستگاه این گونه متفاوت از زیستگاه گونه‌های مذکور است و احتمالاً همین امر باعث شده است که میزان کاتپسین در این گونه نسبت به بقیه گونه‌ها بیش‌تر ترشح شود. نتایج نشان دادند که میزان ایمونوگلبولین موجود در موکوس گاوماهی خالدار بیش‌تر از گاوماهی زرد است. هم‌چنین نتایج حاصل از ارزیابی الگوی پروتئینی نشان داد که تراکم باندها در موکوس گاوماهی زرد بیش‌تر از گاوماهی خالدار است اما تعداد باندهای مشاهده شده در هر دو ماهی برابر بودند. Fagan و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی الگوی پروتئینی ماهی آزاد اقیانوس اطلس در طول دوره تبدیل پار به اسمولت چنین گزارش کردند که تراکم باندهای پروتئینی در پایان دوره بیش‌تر بود. گزارشات متعددی مبنی بر اندازه‌گیری و مقایسه پارامترهای ایمنی موکوس بین گونه‌های مختلف انجام شده است اما مقایسات درون گونه‌ای بسیار اندک است. پایه و اساس این تحقیقات حاکی از وجود خواص ضدمیکروبی ترکیبات موجود در موکوس پوست است. اگرچه Subramanian و همکاران (۲۰۰۷) حضور خواص ضد میکروبی ترکیباتی‌نظیر لیزوزیم، کاتپسین و پروتئازهایی نظیر تریپسین را در چند گونه ماهی گزارش دادند اما در گزارشی دیگر عدم حضور این خواص را متذکر شدند. وجود این اختلافات حاکی از تناقص میان یافته‌ها نمی‌باشد بلکه می‌تواند ناشی از غیرفعال شدن آنزیم‌ها توسط دماو pH در طول‌دوره انکوبه کردن جهت سنجش فعالیت ضدمیکروبی باشد. خواص ضدمیکروبی موکوس می‌تواند به‌دلیل حضور پروتئین‌ها یا پپتیدهای دارای کاتیون فعال و وزن ملکولی کم باشد. این پپتیدها قادرند پاتوژن‌هایی از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، پروتوزواها و ویروس‌ها را به اندام انداخته و آن‌ها را سرکوب کنند (Honcock و Diamond، ۲۰۰۰). کمیت و کیفیت ترکیبات موجود در موکوس می‌تواند تحت تاثیر عوامل محیطی و دستکاری قرار گیرد. وجود اختلافات درون گونه‌ای امری بدیهی است اما شرایط محیطی و نوع زیستگاه می‌تواند بر میزان فعالیت ترکیبات موجود در موکوس تاثیر گذارد بنابراین با توجه به این‌که نمونه‌گیری در این تحقیق به‌صورت مستقیم در جزیره آشوراده انجام شده است پیشنهاد می‌شود که این کار در شرایط یکسان آزمایشگاهی نیز انجام شده و نتایج گزارش شود. در مجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی موکوس گاوماهی زرد در مقایسه با گاوماهی خالدار در سطح بالاتری قرار دارند.

منابع

۱. **Abraham, S.M.; Sharon, N. and Ofek, I., 1999.** Adhesion of bacterial to mucosal surfaces. Mucosal Immunology. Academic Press, San Diego, London. Vol. 3, pp: 31-42.

۲. **Agarwa, S.K.; Banerjee, T.K. and Mittal, A.K., 1979.** Physiological adaptation in relation to hyperosmotic stress in the epidermis of a fresh water teleost *Barbus sophor* (Cypriniformes, Cyprinidae): a histochemical study. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. Vol. 93, pp: 51-64.

۳. **Alexander, J.B. and Ingram, G.I., 1992.** Non cellular non specific defence mechanisms of fish. Annu. Rev. Fish Dis. Vol. 2, pp: 249-279.

۴. **Choi, S.H.; Park, K.H.; Yoon, T.H.; Kim, J.B.; Jang, Y.S. and Choe, C.H., 2008.** Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*A. japonica*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 24, pp: 67-77.

۵. **Clark, DP.; Durell, S.; Maloy, WL.; Zasloff, M. and Rana, L., 1994.** A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. J Biol Chem. Vol. 14, pp: 10849-10855.

۶. **Dhotre, M.A.; Bansode, P.D. and Shembekar, V.S., 2013.** Extraction, Biochemical characterization and antibacterial activity of fish mucus. Indian Streams Res J. 2 Suppl. Vol. 12, pp: 1-8.

۷. **Edwards, E.A. and Twomey, K.A., 1982.** Habitat susceptibility index models: common carp. U.S. Dept. Int. FishWildl. Serv. FWS/OBS-82/10.12. pp: 1-28.

۸. **Ellis, A.E., 1974.** Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes. Dev. Biol. Stand.Vol. 49, pp: 337-352.

۹. **Fagan, M.; O'Byrne-Ring, N.; Ryan, R.; Cotter, D.; Whelan, K. and Mac Evilly, U., 2003.** A biochemical study of mucus lysozyme, proteins and plasma thyroxine of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during smoltification. Aquaculture. Vol. 222, pp: 287-300.

۱۰. **Fast, M.D.; Sims, D.E., Burka, J.F.; Mustafa, A. and Ross, N.W., 2002.** Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 132, pp: 645-657.

۱۱. **Hankock, R.E. and Diamond, G., 2000.** The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends in Microbiology. Vol. 8, pp: 402-410.

۱۲. **Harris, J.E.; Watson, A. and Hunt, S., 1973.** Histochemical analysis of mucous cells in the epidermis of brown trout Salmo trutta L. J Fish Biol. Vol. 5, pp: 345-351.

۱۳. **Hellio, C.; Pons, A.M.; Beaupoil, C.; Bourgougnon, N. and Gal, Y.L., 2002.** Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. Int. J. Antimicrob. Agents. Vol. 20, pp: 214-219.

۱۴. **Iger, Y. and Abraham, M., 1994.** The process of skin healing in experimentally wounded carp. J. Fish Biol. Vol. 36, pp: 421-437.

۱۵. **Ingram, G.A., 1980.** Substances involved in the natural resistance of fish to infection, a review. J. Fish Biol. Vol. 16, pp: 23-60.

۱۶. **Jung, T.S.; Castillo, C.S.D.; javaregowda, P.K.; Dalvi, R.S.; Nho, S.W., Park, S.B.; Jang Cha, I.S.; Sumg, I.S., Hikima, J. and Aoki, T., 2012.** Seasonal variation and comparative analysis of non-specific humoral immune substances in the skin mucus of olive flunder (*Paralihthys olivaceus*). Developmental & Comparative Immunology. Vol. 14, pp: 23-34.

۱۷. **Kaattari, S.L. and Piganell, J.D., 1996.** The specific immune system: humoral defense. In: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), The Fish Immune System. Academic press, NewYork. Vol. 25, pp: 207-254.

۱۸. **Kitani, Y.; Kikuchi, N.; Zhang, G.; Ishizaki Shimakura, K.; Shiomi, K. and Nagashima, Y., 2008.** Antibacterial action of L-amino acid oxidase from the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 149, pp: 394-400.

۱۹. **Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Vol. 227, pp: 680-685.

۲۰. **Negus, V.E., 1963.** The functions of mucus. Acta oto laryngol. Vol. 56, pp: 204-214.

۲۱. **Pickering, A., 1974.** The distribution of mucus cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L). J. Fish Biol. Vol. 6, pp: 111-118.

۲۲. **Rao, V.; Marimuthu, K.; Kupusamy, T.; Rathinam, X.; Arasu, MV. and Al-Dhabi, N.A., 2015.** Defense properties in the epidermal mucus of different freshwater fish species. AACL Bioflux. 8 Suppl. Vol. 2, pp: 184-194.

۲۳. **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. Dis. Aquat. Org. Vol. 41, pp: 43-51.

۲۴. **Sangeetha, S.; Shawna, L.M. and Neil, W.R., 2007.** A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. Vol. 148, pp: 256-263.

۲۵. **Shephard, K.L., 1993.** Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. Vol. 11, pp: 403-417.

۲۶. **Subramanian, S.; MacKinnon, Sh.L. and Ross, N.W., 2007.** A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comprative Biochemistry and Physiology, Part B. Vol. 148, pp: 256-263.

۲۷. **Subramanian, S.; Ross, N.W. and MacKinnon, Sh.L., 2008.** Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 15, pp: 85-92.

۲۸. **Suzuki, Y.; Tasumi, S.; Tsutsui, Sh.; Okamoto, M. and Suetake, H., 2003.** Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. Comprative Biochemistry and Physiology Part B. Vol. 136, pp: 723-730.

۲۹. **Siwicki, A.K. and Anderson, D.P., 1993.** Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn, Poland. Vol. 10, pp: 5-12.

۳۰. **Tabak, L.A., 1995.** In defense of the oral cavity: structure biosynthesis and function of salivary mucins. Annu. Rev. Physiol. Vol. 57, pp: 547-564.

۳۱. **Timalata, K.; Marimuthu, K.; Vengkades, R.; Xavier, R.; Rahman, MA. and Sreeramanan, S., 2015.** Elucidation of innate immune components in the epidermal mucus of different freshwater fish species. Acta Ichthyol Piscatoria. Vol. 3, pp: 221-230.

۳۲. **Villarroel, F.; Bastías, A.; Casado, A.; Amthauer, R. and Concha, M.I., 2007.** Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish. Fish Shellfish Immunol. Vol. 23, pp: 197-209.

۳۳. **Whyte, S.K., 2007.** The innate immune response of finfish e a review of current knowledge. Fish Shellfish Immunol. Vol. 23, pp: 1127-1151.