اثر miR-۷۳۱ بر روی آسیب‌های چشمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در ابتلای به بیماری سپتی‌سمی خونریزی دهنده ویروسی

- **نوشین زمان‌نژاد:** گروه علوم و زیست فناوری جانوری، دانشکده علوم و فن آوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- **محمدرضا بیگدلی*:** گروه علوم و زیست فناوری جانوری، دانشکده علوم و فن آوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- **عباسعلی مطلبی:** گروه علوم پایه و بهداشت، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران
- **حمید کهرام:** گروه فیزیولوژی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **عادل حقیقی‌خیابانیان‌اصل:** گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۷

چکیده

در میان بیماری‌های مختلف ویروسی در ماهی، ویروس (VHSV) به‌عنوان مهم‌ترین عفونت ویروسی در ماهی قزل‌آلا شناخته شده است. در بررسی حاضر، تأثیر miR-731 بر روی آسیب دیدگی چشم یا اگزوفتالمی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) بررسی شده است. در این آزمایش، ماهی‌های (۱±۲۰) گرم برای تعیین احتمال پیشگیری بیماری VHS با miRNA در چهار گروه اصلی و سه تکرار، شاهد منفی بدون تزریق، فیزیولوژی با تزریق سالین، شاهد مثبت با تزریق VHSV و گروه آزمایشی با تزریق miRNA و سپس تزریق ویروس تقسیم‌بندی شدند. فعالیت کربنیک آنهیدراز (CA) نقش مهمی در کنترل و تنظیم فشار داخل چشم دارد که مقدار آن در گروه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که تمام حیوانات در شاهد مثبت دچار اگزوفتالمی شدند، در گروه شاهد منفی، گروه فیزیولوژی و گروه آزمایشی اثری از اگزوفتالمی مشاهده نشد و تفاوت معنی‌داری بین میزان آنزیم کربنیک آنهیدراز در گروه شاهد مثبت با سایر گروه‌ها وجود داشت (P<۰/۰۵). مطالعات بیش‌تری برای تایید مکانیسم دقیق مهار ویروس توسط miRNA مورد نیاز است، اما نتایج حاضر تا حدی نشان‌دهنده کاهش علائم بیماری در چشم توسط miRNA در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقابل عفونت VHSV است.

کلمات کلیدی: سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی، اگزوفتالمی، کربنیک آنهیدراز، miRNA

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: bigdelimohammadreza@yahoo.com

مقدمه

بیماری ویروسی Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) از بیماری‌های مخاطره‌آمیز در صنعت تکثیر و پرورش ماهی‌های سردآبی بوده و همه ساله به‌دلیل عدم تشخیص دقیق و به موقع، ضررهای اقتصادی جبران‌ناپذیری به کشور وارد می‌گردد که می‌توان با شناسایی مطمئن و دقیق کانون‌های آلوده در کشور و تأیید وقوع بیماری مورد نظر، بلافاصله اقدام به مهار و کنترل آن نمود و با کمک برنامه‌های ریشه‌کنی و برنامه کنترلی قرنطینه‌ای و یا واکسیناسیون درخصوص این بیماری از شیوع آن جلوگیری نمود (Sharifnia و Kazemi، ۲۰۰۸). عامل این بیماری یک رابدو ویروس است که به جنس NovirhabdoVirus تعلق دارد. زمانی که ویروس به یک مزرعه وارد می‌شود، بیماری ممکن است در بین گونه‌های حساس ماهی‌های وحشی رودخانه‌ها استقرار یابد. لارو ماهی حساس‌ترین مرحله‌ای است که به بیماری درگیر می‌شود. ماهی‌های مسن‌تر به‌طور مشخص مقاوم‌ترند. حساسیت به بیماری در بین ماهی‌ها به‌میزان زیادی متفاوت است. در ماهی‌هایی که از تغذیه و وضعیت بهداشتی بهتری برخوردارند تظاهرات بالینی بیماری کم‌تر دیده می شود (Fauquet و همکاران، ۲۰۱۲). ویروس عامل این بیماری بر بیش از ۵۷ گونه ماهی موثر است و باعث آسیب جدی به صنعت آبزی‌پروری در جهان می‌شود. در دهه‌های اخیر، گزارش شده که میزان پراکندگی جغرافیایی بیماری در جهان افزایش یافته است (Cornwel و همکاران، ۲۰۱۱). ظهور بیماری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) با مرگ و میر زیاد و آسیب شدید در صنعت آبزی‌پروری در این تحقیق مورد توجه قرار گرفته است. همگام با ورود ویروس و رها شدن ویریون‌ها به سیتوپلاسم سلول میزبان سنتز RNA ویروسی شروع شده و فرایند بیوسنتتیک در رپلیکاسیون ویروس یا همان نسخه‌برداری اولیه توسط RNA وابسته به RNA polymerase انجام می‌گردد (Fields و همکاران، ۱۹۹۶). هم‌چنین آخرین مرحله در چرخه رپلیکاسیون ویروس (assemble) تقریباً هم‌زمان با رونویسی ثانویه (حدود ۲ تا ۳ ساعت پس از عفونت) شروع می‌شود و حداکثر حدود ۸ تا ۱۰ ساعت پس از عفونت، زمانی که سنتز پروتئین ویروسی در حداکثر خود قرار دارد، هم‌زمان با کاهش سنتز پروتئین، ویروس به سمت پایان چرخه عفونی رفته و در حدود ۱۶ تا ۲۰ ساعت بعد عفونت کاهش می‌یابد. اگزوفتالمی یکی از علائم ظاهری این بیماری است که برای فهم رابطه بین آنزیم کربنیک آنهیدراز و تجمع گاز در چشم آزمایشاتی طراحی شده است (Gultepe و همکاران، ۲۰۱۱). علائم gas bubble در چشم‌ها به‌علت تجمع گاز در چشم‌ها اتفاق می‌افتد. پس از ابتلا به ویروس ماهی‌ها دچار تجمع شدید حباب گازی در آبشش‌ها شده و هم‌چنین افزایش فشار جزئی توسط شبکه کوروئید که یک لایه عروقی) بوده و دور تا دور شبکیه را احاطه کرده است، انجام می‌پذیرد و فشار موضعی ناکافی موجب اگزوفتالمی می‌شود. خونریزی‌های موضعی نیز در نواحی اطراف کره چشم دیده‌شده و تجمع بالای گاز در ناحیه آبشش موجب مرگ ماهی می‌گردد. کربنیک آنهیدراز آنزیم مهمی است که نه تنها موجب زدودن CO_2 بلکه موجب تنظیم حرکت پروتون‌ها و یون‌های دیگر بین سلول و مایع خارج سلولی گردیده و نقش اساسی را در تنظیم pH داراست. فعالیت CA در مژه‌ها، شبکیه و عنبیه دیده شده است. در مجموع Dissolved gas super saturation (DGs) موجب کاهش فعالیت آنزیم CA در لنز ماهی قزل‌آلا می‌گردد (Gultepe و همکاران، ۲۰۱۱). آنزیم کربنیک آنهیدراز از اعضای zinc metalloenzymes بوده و حداقل ۱۴ نوع isozymes از این آنزیم شناسایی شده است که دارای فعالیت‌های متفاوتی از قبیل ویژگی‌های بافتی و نقش‌های فیزیولوژیک مانند انتقال گاز CO_2 و یون بی‌کربنات (HCO_3) بین بافت‌های متابولیزه کننده و آبشش‌ها، هوموستازی pH، انتقال سیگنال سلولی و ترشح الکترولیت‌ها در بافت‌های مختلف ارگان‌های مهره‌داران هستند (Hisar و همکاران، ۲۰۰۷). ایزوزیم‌ها به شکل‌های، سیتوزولی (II, III و VII، CA I)، غشایی (CA IV, IX, XII و XIV)، میتوکندریایی، ترشحی و فرم acatalytic موجود هستند (Supuran و Scozzafava، ۲۰۰۲). فرم CA II طبق آزمایشات ایمنوهیستوشیمی فراوان‌ترین نوع ایزوزیم در چشم در ناحیه سلول‌های اپیتلیالی مژکی، سلول‌های مولر شبکیه می‌باشد. فعالیت بالای کاتالیز CA isozyme، HCO_3- در اپیتلیوم موجب تولید مایع و تنظیم فشار چشم است (Henry و همکاران، ۲۰۰۰؛ Baird و همکاران، ۱۹۹۷). میکروRNAها ریبونوکلئیک اسیدهای کوچک و غیر کدکننده هستند. تک رشته‌ای بوده و ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید دارند. در تنظیم بیان ژن، پس از رونویسی نقش مهمی را ایفاء می‌کنند. یک میکروRNA به تنهایی می‌تواند موجب تنظیم کاهشی چندین رونوشت mRNA هدف شود. اخیراً میکروRNAها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی بلوغ، حفظ هومئوستاز و عملکرد طبیعی ایمنی پدیدار شده‌اند. نقش تنظیمی میکروRNAها به مشخص‌تر شدن نحوه بیان و عملکرد ژن‌های موجودات در طی تکوین، رشد موجودات، تشخیص و درمان بیماری‌ها به‌عنوان بیومارکرها یا شناساگرهای زیستی مورد توجه قرار گرفته است (Lin و Ying، ۲۰۰۶). تزریق درون صفاقی و یا درون‌وریدی انواع مختلف miRNA و بررسی اثرات حفاظتی آن‌ها در بیماری‌های تخریب‌کننده اعصاب در تعداد وسیعی از آزمایشات مورد مطالعه قرار گرفته است (Van Rooij، ۲۰۱۲). یکی از انواع این میکروRNAها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، طبق تحقیقات صورت پذیرفته احتمال توانایی کاهش تکثیر ویروس VHS را ممکن است (Bela Ong، ۲۰۱۴) داشته باشد که در این تحقیق بررسی اثر miR-731 در ناحیه

چشم در بیماری سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده ویروسی(VHS)درماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تحقیقات در زمینه ماهی با اجازه کمیته پشتیبانی حمایت از حیوانات دانشگاه شهیدبهشتی انجام شد. تعداد ۲۴۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سالم با مجوز گواهی سلامت از سازمان دامپزشکی کل کشور از مزرعه واقع در فیروزکوه خریداری و توسط خودروی مخصوص حمل ماهی به ایستگاه تحقیقاتی پارک ملی خجیر منتقل شد و در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۲۷۰ لیتری تعبیه‌شده در اتاق چالش ویروس که مورد تایید سازمان دامپزشکی کل کشور بود، توزیع شدند (هرکدام ۲۰ ماهی) و مورد آداپتاسیون قرار گرفتند. مخزن ۲۰۰۰ لیتری برای ویروس‌زدایی پساب برای انجام آزمایش پیش‌بینی گردید. برای اطمینان از سلامت ماهی‌ها، با روش QRT-PCR سلامت ماهی‌ها از طریق آزمایشگاه ملی مرجع سازمان دامپزشکی از نظر عدم حضور بیماری‌های اخطارکردنی سازمان (OIE، ۲۰۰۶) تائید گردید. در طول آزمون، مقدار اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)، pH و دما (درجه سانتی‌گراد) به‌ترتیب ۷/۵ تا ۹، ۱/۹±۷/۹ و ۰/۵±۱۴/۹ بود. ماهی‌ها در مخازن پر شده با آب فیلتر شده، بدون کلر نگه‌داری شدند. در راستای فراهم آوردن شرایط مشابه فیزیولوژیک طبیعی روزانه ازجمله ساعت زیستی، ماهی‌ها در یک دوره نوری و تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پنجاه درصد از تمام آب مخازن روزانه به‌طور مداوم توسط پمپ آب تعویض گردید و پساب به مخزن ۲۰۰۰ لیتری هدایت‌شده و ازآن‌جا بعد از ضدعفونی به چاه سپتیک هدایت شد. ماهی‌های قزل آلا سه بار در روز با غذای شرکت چینه تغذیه شدند و پس از شروع آزمایش به‌مدت ۴۵ روز برای بررسی فاکتورهای رشد و بقا نگه‌داری شدند. miR-731 به‌عنوان یک miRNA فیزیولوژیک توسط شرکت Gene Pharma(Bela-Ong، ۲۰۱۴)طراحی و سفارش داده شد. ویروس سویه (VHS DK-3592B) (Asl، ۲۰۱۱) جداشده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با عیار تقریبی ۱۰۴ TCID50/ml تزریق شد که توسط آزمایشگاه مرجع ملی، علوم کاربردی و تشخیص سازمان دامپزشکی کشور تهیه شده بود (Zhang و همکاران، ۲۰۱۶).

بررسی اگزوفتالمی با استفاده از سنجش از طریق کربنیک آنهیدراز: پس از اولین مشاهده علائم بیماری و بیرون‌زدگی چشم (اگزوفتالمی)(شکل ۱)، ثبت مشاهدات در روزهای ۱، ۴، ۸ و ۱۲ انجام گردید. ۴ماهی از هرگروه به‌طور تصادفی انتخاب‌شده‌و در سطل حاوی غلظت کشنده(۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر) بافر (tricaine methanesulfonate MS-222) قرار گرفتند. عدسی و شبکیه به‌همراه شبکه کوروئید از چشم ماهی‌های کشته شده خارج شد. ساختمان چشمی در نیتروژن مایع فریزشده و در مدیای هموژن (Lionetto و همکاران، ۲۰۱۱) قرار داده شد و سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ گردید (Henry و همکاران، ۲۰۰۰). آنزیم کربنیک آنهیدراز (;CA; carbonate hydrolyase, enzyme code 4.2.1.1 IUBMB ۱۹۹۲)از شرکت میراژن تهیه گردید. سوپرناتانت برای فعالیت آنزیمی کربنیک آنهیدراز بافت هدف استفاده شد. آنالیز بیوشیمیایی با استفاده از فعالیت هیدراتاز CO2 آنزیم کربنیک آنهیدراز با استفاده از متد اسپکتروفتومتری سنجش شد. فعالیت CO2 هیدراتاز محاسبه گردید. برای سنجش فعالیت‌های آنزیمی کربنیک آنهیدراز در لنز و بافت رتینال، از طریق اسپکتروفوتومتری در طول موج (۵۹۵ نانومتر) اندازه‌گیری گردید (Gultepe و همکاران، ۲۰۱۱).

شکل ۱: علائم بیرون‌زدگی چشم همراه با هموراژی در ماهی‌های قزل‌آلای مبتلا به بیماری VHS

براساس نتایج حاصل از آزمون کلموگروف‌اسمیرنوف جهت برآورد نرمال بودن توزیع داده‌ها، تمامی داده‌ها از توزیع نرمال پیروی کردند P>۰/۰۵. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار تنظیم و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های شاهد و تیمار توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و مرکب در صورت معنی‌دار بودن از آزمون تعقیبی دانکن در سطح معنی‌دار (P<۰/۰۵) استفاده شد.

نتایج

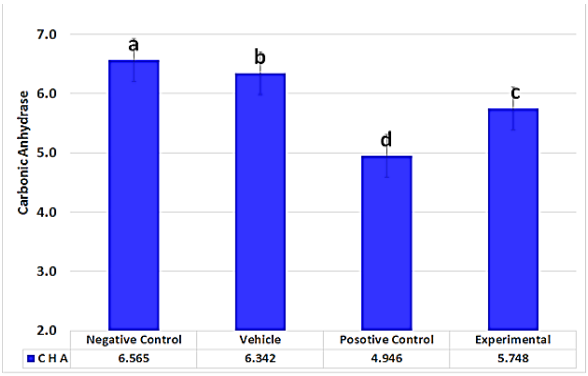
بررسی مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز نمونه‌های چشم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان: براساس نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز طبق پروتکل با استفاده از نمونه‌های عصاره چشم ماهی در گروه‌های مختلف آزمایشی، مشخص گردید. بررسی نتایج مقایسه میانگین مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز نمونه‌های عصاره چشم ماهی بعد از تزریق در گروه شاهد مثبت نشان داد که ویروس بر روی مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز نمونه‌ها اثر گذاشته به‌طوری‌که بیش‌ترین میانگین آنزیم کربنیک آنهیدراز با مقدار ۶/۵۶۵ در گروه شاهد منفی مشاهده گردید و کم‌ترین مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز

نیز در گروه شاهد مثبت با میانگین ۴/۹۵۶ به دست آمد که بین آن‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. هم‌چنین بین گروه فیزیولوژی با میانگین مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز ۶/۳۴۲ با سه گروه دیگر اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید و بین گروه آزمایشی (miRNA+ ویروس) با میانگین ۵/۷۴۸ با سه گروه دیگر اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد کاربرد miRNA با مهار تکثیر ویروس در کاهش مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز در چشم ماهی موثر بوده است. به‌طور کلی گروه آزمایشی (miRNA+ ویروس) نسبت به شاهد مثبت موجب افزایش ۱۶٪ در مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز گردید (جدول ۱ و شکل ۲).

جدول ۱. مقایسه میانگین مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز عصاره چشم ماهی قزل‌آلا تحت تاثیر گروه‌های آزمایشی

تیمار	میانگین مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز نمونه‌های چشم ماهی
شاهد منفی	۶/۵۶۵a
فیزیولوژی	۶/۳۴۲b
شاهد مثبت	۴/۹۵۶d
آزمایشی	۵/۷۴۸c

میانگین هایی که با حروف مختلف نشان داده شدند در آزمون دانکن در سطح احتمال p<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند



شکل ۲: مقایسه میانگین مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز عصاره چشم ماهی قزل‌آلا تحت تاثیر گروه‌های آزمایشی

(میانگین‌های که با حروف مختلف نشان داده شدند در آزمون دانکن در سطح احتمال P <۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند)

بحث

بیماری VHS به‌عنوان یکی از بیماری‌های مهم ویروسی در مناطق مختلف دنیا گسترش یافته و تاکنون موجب خسارات فراوانی به صنعت آبزی‌پروری به‌ویژه ماهیان سردآبی ازجمله قزل‌آلا شده است، لذا در سال‌های اخیر خسارات و تلفات ناشی از این بیماری موجب مطالعات گسترده در ایران و جهان برای پیشگیری و مقابله با این بیماری شده است. این تحقیق به‌منظور بررسی اثرات مهاری miR-731 برروی ویروس VHS در بافت چشم صورت پذیرفته است. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر تاثیرات تزریق داخل صفاقی miR-731 در تغییر وضعیت علامت شایع بیرون‌زدگی چشم در بیماری سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است (Sandlund و همکاران، ۲۰۱۴). با توجه به مقایسه نتایج که در این مطالعه انجام گرفته علاوه بر این که تأیید تشخیصی به‌صورت مقایسه‌ای نسبت به همدیگر می‌باشند، نقطهٔ قوتی در امر تشخیص نهایی نیز می‌باشد. البته در کنار این آزمایش، بررسی‌های پاتولوژیکی دقیق و حساسی هم‌چون بافت‌شناسی و ایمنو هیستوشیمی در بافت مغز، بررسی نفوذپذیری سد خونی مغزی و بیان برخی ژن‌های مغزی در کنار بیان سطوح ویروس از روش RT-Real time PCR در گروه‌های مختلف صورت پذیرفته و در مقالات دیگری بیان شده است. در این مقاله تنها بر روی مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز بافت چشم بررسی صورت گرفته است. با توجه به این‌که روش‌های تشخیصی نظیر Elisa، Florescent Ab test و اسپکتروفتومتری برای تشخیص علائم بیماری (VHS) در چشم کاربرد دارد ولی به‌لحاظ بروز واکنش‌های متقاطع بین ویروس‌های دیگر با عامل مولد بیماری VHS، احتمال بروز خطا در تفسیر این آزمایش‌ها وجود دارد، لذا یک روش تشخیص حساس و مطمئن‌تر مثل PCR، جهت مقایسهٔ نتایج روش‌ها مورد نیاز است (Kirkan و همکاران، ۲۰۱۸). از تعداد کل نمونه‌های چشم بررسی شده در چهار گروه آزمایشی به‌روش تشخیص مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز مشخص شد که گروه شاهد مثبت دارای اختلاف معنی‌دار کاهشی با سه گروه دیگر می‌باشد و از طرفی گروه آزمایشی نیز با گروه شاهد مثبت و گروه‌های دیگر دارای اختلاف معنی‌دار در مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز به‌روش اسپکتروفتومتری نشان می‌دادند (P<۰/۰۵). این مطالعه نشان داد مقدار آنزیم کربنیک آنهیدراز در ماهی‌های آلوده و بیمار با علامت بیرون‌زدگی چشم(اگزوفتالمی) کم‌تر از ماهی‌های سالم بود. هم‌چنین نشان‌داد در گروه آزمایشی که miRNA را قبل از ابتلا به ویروس دریافت کرده بودند مقدار این آنزیم با اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد مثبت روندافزایشی را نشان می‌دهد که می‌تواند ارتباطی به امکان کنترل مهار ویروس توسط miRNA را داشته باشد که در آزمایشات تکمیلی توسط Zamannejad و همکاران (۱۳۹۷) موردبررسی قرار گرفته‌است. هم‌چنین Mitro و White (۲۰۰۸) در آزمایشی در مورد سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی و آبزی‌پروری در آب‌شیرین در مورد اثرات بیماری و علائم بیماری در جمعیت‌های مختلف ایالت Wisconsin در آمریکا تحقیق و بررسی کردند و اگزوفتالمی را به‌عنوان یکی از علائم بارز بیماری مطرح نمودند. Gultepe و همکاران (۲۰۱۱) در مورد ارتباط بین آنزیم کربنیک آنهیدراز و تشکیل

حباب در چشم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحقیق کردند و متوجه امکان این ارتباط گردیدند. انتقال گازهای حل شده به بافت‌ها با انتشار ساده در امتداد یک شیب انتشار اتفاق می‌افتد. لذا انتظار می‌رود فشار جزئی گاز حل شده در بافت کم‌تر از فشار جزئی محیط باشد. افزایش فشار جزئی توسط غده کوروئید انجام می‌پذیرد و فشار غیرکافی هیدروستاتیک موجب اگزوفتالمی می‌گردد. در این راستا خونریزی در بافت چشم به‌صورت petechiae مشاهده گردیده است. ایجاد حباب چشمی یا اگزوفتالمی بادرد و بی‌قراری برای ماهی همراه است (Gultepe و همکاران، ۲۰۱۱). کربنیک آنهیدراز آنزیم مهمی است که نه تنها بر حذف CO2 از محیط تاثیر می‌گذارد بلکه موجب تنظیم حرکات پروتون‌ها و یون‌ها بین سلول‌ها و مایعات خارج سلولی شده و نقش مهمی در تنظیم pH دارد (Supuran و Scozzafava، ۲۰۰۲). Maren و Frederick (۱۹۸۵) متوجه شدند که فعالیت کربنیک آنهیدراز در ناحیه مژگانی، عنبیه و شبکیه چشم است. مهار فعالیت آن می‌تواند منجر به تغییرات فیزیولوژیکی مهم شود. به‌عنوان مثال، مهار فعالیت CA موجب کاهش میزان جذب بی‌کربنات شده و با اسیدی‌شدن ادرار در کلیه‌ها، درنهایت منجر به اسیدوز متابولیک می‌شود. علاوه بر این، مهار فعالیت کربنیک آنهیدراز در اریتروسیت‌ها باعث ایجاد اسیدوز در خون ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان می‌گردد. اسیدوز موضعی موجب ترشح اکسیژن به مثانه و ایجاد اسیدوز عمومی شده و لذا حمل اکسیژن را کاهش می‌دهد. این ضعف، با تنظیم pH توسط اریتروسیت از طریق catecholamines در ماهی به حداقل می‌رسد. یک مکانیسم مشابه برای تبادل اکسیژن در شبکه کوروئید چشم وجود دارد. به‌نظر می‌رسد ماهی‌های آسیب دیده دارای مقادیر متوسط و بالاتر از pO2، pCO2، COHb و HCO3- در خون وریدی شبکه کوروئید نسبت به حالت طبیعی هستند. اما ماهی‌های مبتلا به مقدار نسبتاً پایین‌تری در خون وریدی O2Hb و همراه با pH پایین‌تر دارند. افزایش قابل توجهی در pO2، pCO2 و HCO3- در ماهی‌های مبتلا نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض انتقال بیش از حد TDG (Total dissolved gas) مقدار کل گاز غیرمحلول موجب بالا رفتن سطح اشباع خون می‌شود. احتمالاً این وضعیت با کاهش pH در خون تشدید می‌شود که موجب اشباع اکسیژن هموگلوبین از طریق اثر بور شده و لذا اکسیژن را از هموگلوبین در غلظت‌های بالاتر خون آزاد می‌کند به این شکل که در هر فشارجزئی معین از گاز اکسیژن، هرچه pH خون بالاتر باشد، درصد سیرشدن هموگلوبین از اکسیژن نیز بالاتر می‌رودو برعکس،هرچه این فشار جزئی پائین‌تر بیاید اکسیژن بیش‌تر از هموگلوبین آزاد می‌شود. علت این رویداد آن است که هموگلوبین ضمن جذب اکسیژن، یونیزه می‌شود. یعنی به‌ازای هر مولکول اکسیژن که جذب می‌کند، یک پروتون آزاد می‌کند. این نتایج با آزمایشات Pedersen و همکاران (۲۰۰۶)، هم‌خوانی دارد. آن‌ها مشاهده کردند که ارتباط بین pH خون و pH داخل چشم وجود دارد. البته مهار CA در عدسی احتمالاً به‌طور کامل و با تغییر pH در خون و چشم وابسته نبوده و انباشت CO2 و O2 در مایع زجاجیه و زلالیه، با کاهش pH چشم مرتبط بوده و علت احتمالی مهار فعالیت کربنیک آنهیدراز در عدسی چشم ماهی است. قبلاً گزارش شده که ایزوزیم کربنیک آنهیدراز در عدسی ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان دارای pH مطلوب ۹/۵ است لذا سطح پایین فعالیت این آنزیم احتمالاً به‌دلیل فقدان انتقال پروتونی کارآمد است (Beydemir و همکاران، ۲۰۰۶).در برخی موارد حباب‌های گازی ممکن است در قسمت‌های مختلف بدن در بیماری‌های نورولوژیکی، انواع هموراژی و osmoregulatory دیده شوند (Gultepe و همکاران، ۲۰۱۱؛ Shrimpton و همکاران، ۱۹۹۰). لذا بسته به ارتباط بین TGP در ماهی با اگزوفتالمی ممکن است علائم بالینی متنوعی وجود داشته باشد. به‌طور خلاصه می‌توان نتیجه گرفت که DGS در نتیجه التهاب ناشی از بیماری ویروسی می‌تواند فعالیت آنزیم کربنیک آنهیدراز در عدسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را کاهش دهد. از طرفی تزریق داخل‌صفاقی miR-731، طبق تحقیقات صورت‌پذیرفته احتمال توانایی کاهش تکثیر ویروس VHS را ممکن است داشته باشد که در نتایج به‌طور عمده مشاهده می‌گردد (Bela-Ong، ۲۰۱۴). miR-731 موجب افزایش تکثیر ویروس در محیط invivo می‌شود و به‌عنوان تنظیم کننده تکثیر ویروسی در ماهی‌های استخوانی و ازجمله ماهی قزل‌آلا است(Bela-Ong، ۲۰۱۴). آلودگی ویروسی در ماهی موجب‌القا آپوپتوز در splenocyteها و توقف چرخه سلولی است که هر دو به‌طور معنی‌داری توسط میکروRNA کاهش‌یافته و توسط مهارکننده افزایش می‌یابند درحالی‌که اثر مهاری پیش‌برنده میکروRNA روی آپوپتوز و چرخه سلولی با بیان ویژه p53 ارتباط دارد(Huang و همکاران، ۲۰۱۵). نتایج نشان می‌دهد که میکروRNA آپوپتوز را کاهش داده و توقف چرخه سلولی با توقف بیان p53 انجام می‌گیرد. سعی می‌شود با میزبان‌های طبیعی از تکثیر ویروس جلوگیری شود (Bela-Ong، ۲۰۱۴). این نوع miRNA در ماهی‌های استخوانی موجب افزایش بیان می‌شود و سبب مهار القاء ویروس، پاسخ نوع خاص اینترفرون، آپوپتوز و توقف چرخه سلولی می‌گردد. مهار تکثیر ویروس در مراحل اولیه آلودگی به‌طور مشخص‌موجب، بیان فاکتور تنظیمی اینترفرون(IRF7)و تومور سلولی آنتی‌ژن p53(Nudelman و همکاران، ۲۰۱۰)در سکانس ترجمه نشدنی ناحیه ۳' از (IRF7) و p53 می‌گردد. نتایج حاصل از این آزمایش و آزمایشات تکمیلی که در مقالات دیگر مولف در مورد بیان ژن‌های مغزی و ویروس و هم‌چنین تست‌های سرولوژی، بافت‌شناسی، ایمنو هیستوشیمی و سد خونی مغزی بیان شده نشان‌دهنده اثر احتمالی مهار فعالیت ویروس سپتی‌سمی هموراژیک در ماهی قزل‌آلا در ناحیه

چشم توسط miR-731 می‌باشد. تاکنون واکسن تجاری با کارایی بالا و هزینه قابل‌قبول،علیه این بیماری در دسترس نبوده است لذا موضوع پیشگیری‌بیماری به‌روش‌واکسیناسیون یکی از نیازهای تحقیقاتی آتی در صنعت آبزی‌پروری است. انجام آزمایشات‌تکمیلی و تعیین دوز موثر تزریق miRNA پیش از وقوع بیماری می‌تواند افق روشنی را در تهیه واکسن این بیماری برای اولین بار در کشور به پیش روی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نهایت تشکر و قدردانی خود را از آقای دکتر مرتضی تقی‌زاده، خانم‌دکتر مریم دادار و آقای دکتر کاووس نظری ابراز نموده و هم‌چنین سپاس‌بیکران خود‌را‌از همکاری‌دانشگاه‌شهیدبهشتی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران که در راستای انجام این آزمایش کمک‌های شایانی کردند، صمیمانه اعلام می‌دارد.

منابع

۱. **Baird, T.T.Jr.; Waheed, T.; Okuyama, T.; Sly, W.S. and Fierke, C.A., 1997.** Catalysis and inhibition of human carbonic anhydrase IV. Biochemistry. Vol. 36, pp: 2669-2678.

۲. **Bela-Ong, D.B., 2014.** Rhabdovirus-induced micro ribonucleic acids in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss Walbaum*). PhD Thesis, National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Denmark.

۳. **Beydemir, S.; Bulbul, M.; Hisar, O.; Soyut, H. and Yanik, T., 2006.** Carbonic anhydrase: affinity purification and kinetic properties from rainbow trout lens. International Journal of Applied Chemistry. Vol. 2, pp: 45-55.

۴. **Cornwell, E.R.; Eckerlin, G.E.; Getchell, R.G; Groocock, G.H.; Thompson, T.M.; Batts, W.N.; Casey, R.N.; Kurath, G.; Winton, J.R.; Bowser, P.R. and Bain, M.B., 2011.** Detection of viral hemorrhagic septicemia virus by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction from two fish species at two sites in Lake Superior, Journal of aquatic animal health. pp: 207-217.

۵. **Fields, B. N., 1996.** Fundamental virology, Lippincott-Raven Philadelphia, ePA PA.

۶. **Francki, R.I.B.; Fauquet, C.M.; Knudson, D.L. and Brown, F. eds., 2012.** Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division of the International Union of Microbiological Societies. Springer Science & Business Media. Vol. 2.

۷. **Gültepe, N.; Ateş, O.; Hisar, O. and Beydemir, Ş., 2011.** Carbonic Anhydrase Activities from the Rainbow Trout Lens Correspond to the Development of Acute Gas Bubble Disease, Journal of Aquatic Animal Health. pp: 134-139.

۸. **Henry, R.P.; Gilmour, K.M.; Wood, C.M. and Perry, S.F., 2000.** Extracellular carbonic anhydrase activity and carbonic anhydrase inhibitors in the circulatory system of fish. Physiological Zoology. Vol. 70, pp: 650-659.

۹. **Hisar, O.; Aras Hisar, S.; Sirkecioglu, A.N.; Karatas, M. and Yanik, T., 2007.** Using an oxygenating and degassing column to improve water quality in salmonid hatcheries. International Journal of Natural and Engineering Sciences. Vol. 1, pp: 63-64.

۱۰. **Huang, C.X.; Chen, N.; Wu, X.J.; Huang, C.H.; He, Y.; Tang, R.; Wang, W.M. and Wang, H.L., 2015.** The zebrafish miR-462/miR-731 cluster is induced under hypoxic stressvia hypoxia-inducible factor 1a and functions in cellular adaptations, The FASEB Journal article fj.14 Published online. Vol. 11, pp: 4901-4913.

۱۱. **Kİrkan, S.; Parİn, U. and Dolgun, O., 2018.** Identification of Lactococcus garvieae by PCR from rainbow trout and investigation of susceptibility to antibiotics. International Journal of Veterinary Science. Vol. 7, No. 1, pp: 28-32.

۱۲. **Lee, R.C., 1993.** The C. Elegans heterochronic gene line 4 encodes small RNAs with antisense Complementarity to Lin 14 cell. Vol. 75, No. 5, pp: 843-854.

۱۳. **Lin, S.L. and Ying, S.Y., 2006.** Gene silencing invitro and invivo using intronic microRNAs. In MicroRNA Protocols. pp: 295-312.

۱۴. **Lionetto, M.G.; Giordano, M.E.; Vilella, S. and Schettino, T., 2000.** Inhibition of eel enzymatic activities by Cd, Aquatic Toxicology, pp: 561-571.

۱۵. **Mitro, M.G. and White, A.L., 2008.** Viral hemorrhagic septicemia and freshwater fisheries: The State of the Science. Department of Natural Resources.

۱۶. **Maren, T.H. and Frederick, A., 1958.** Carbonic anhydrase inhibition in the elasmobranch. Federation Proceedings. Vol. 17, 391 p.

۱۷. **Nudelman, A.S.; DiRocco, D.P.; Lambert, T.J.; Garelick, M.G.; Le, J.; Nathanson, N.M. and Storm, D.R., 2010,** Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB regulated microRNA-132, in vivo. Hippocampus. pp: 492-498.

۱۸. **OIE. Office International de Epizooties. 2006.** International aquatic animal Health Code. Fish, mollusks and crustaceans. Fifth edition. Page: 469 notifiable diseases chapter 2.1.5. pp: 141-158.

۱۹. **Pedersen, D.B.; Stefansson, E.; Kiilgaard, J.F.; Jensen, P.k.; Eysteinsson, T.; Bang, K. and Cour, M.L., 2006.** Optic nerve pH and PO2: the effects of carbonic anhydrase inhibition, and metabolic and respiratory acidosis. Acta Ophthalmologica Scandinavica. Vol. 84, pp: 475-480.

۲۰. **Sandlund, N.; Gjerset, B.; Bergh, Ø.; Modahl, I.; Olesen, N. J. and Johansen, R., 2014.** Screening for Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Marine Fish along the Norwegian Coastal Line. Plos One. Vol. 9, No. 9, pp: 1-12.

۲۱. **Sharifnia, Z. and Kazemi, B., 2008.** Diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Iranian rainbow trout aquaculture by pathology and molecular techniques. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. Vol. 28, No. 5, pp:170.

۲۲. **Shrimpton, J.M.; Randall, D.J. and Fidler, L.E., 1990.** Factors affecting swim bladder volume in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* held in gas supersaturated water. Canadian Journal of Zoology. Vol. 68, pp: 962-968.

۲۳. **Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2002.** Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. Expert Opinion on Therapeutic Patents. Vol. 12, pp: 217-242.

۲۴. **Van Rooij, E., 2012.** MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. Nat. Rev. Drug Discovery. pp: 860-872.

۲۵. **Zamannejad, N; Bigdeli, M.R; Motallebi, A; Kohram, H. and Haghighi, Kh.A.A., 2018.** The pretreatment potential effects of miR-731 in impaired brain tissue of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* infected with viral hemorrhagic septicemia virus, Iranian Journal of Fisheries Sciences.

۲۶. **Zhang, B.C.; Zhou, Z.J. and Sun, L.; 2016.** pol-miR-731, a teleost miRNA upregulated by megalocytivirus, negatively regulates virus-induced type I interferon response, apoptosis, and cell cycle arrest. Scientific reports. Vol. 6, 28354 p.