

مطالعه ساختار بیوشیمیایی و خواص آنتی باکتریایی همولنف جنس نر و

ماده میگوی آب شیرین (*Macrobrachium nipponense*)

کتایون کریمزاده^{۱*}، عسگر زحمتکش^۲، معصومه پرمهر^۱

چکیده

و یا مقاومت (ایمنی) اکتسابی است. که شامل پاسخ‌های ایمنی سلولار و همورال می‌باشد. این پاسخ‌ها با تولید عوامل انعقاد کننده خون، ملانیزه شدن و پپتیدهای ضد میکروبی و فاگوسیتوز کننده میکروارگانسیم‌های پانوزن در هموسیت‌ها همراه است (۱۳). همولنف در سخت‌پوستان شامل سلول‌های دفاعی هموسیت است که در میگوی آب شیرین مانند سایر سخت‌پوستان در پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان نقش مهمی به عهده دارد (۱۳ و ۱۰).

در سال‌های اخیر مشخص شده است که بسیاری از موجودات از پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptides; AMPs) که بخشی از سیستم دفاعی آنها می‌باشند جهت دفاع در برابر حمله میکروارگانسیم‌ها استفاده می‌کنند (۲۶ و ۳).

پپتیدهای ضد میکروبی AMPs از اجزای اصلی سیستم دفاعی ذاتی بسیاری از موجودات سخت‌پوستان می‌باشند که نقش مهمی در حفاظت میزبان از هجوم میکروب‌ها به عهده دارند (۲۶). پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس طول و ساختارهای دوم و سوم پروتئین‌ها، حضور و عدم حضور پیوندهای سولفیدی به گروه‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شود (۲۶ و ۱۹). وجود اطلاعات در خصوص اهمیت بالینی این پپتیدها منجر به بررسی آنها در میگوی آب شیرین شده است حضور ترکیبات زیست فعال بسیاری در همولنف سخت‌پوستان گزارش شده است که دارای خواص بیولوژیک هستند (۲۵). در مطالعاتی که روی همولنف سخت‌پوستان بویژه خرچنگ‌ها و میگوها صورت گرفته شده است، خواص دارویی مانند خواص ضدسرطانی (۲۲) و آنتی اکسیدانی آن گزارش شده است (۱۲).

هدف از مطالعه حاضر شناسایی ساختار بیوشیمیایی همولنف میگوی آب شیرین (*Macrobrachium nipponense*) و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن در دوزهای مختلف بر روی چند سویه پانوزن می‌باشد. بدین منظور ۸۰ عدد میگوی آب شیرین با میانگین طولی $12 \pm 1/0$ سانتی متر از تالاب انزلی جمع‌آوری گردید. پس از جداسازی جنس‌های نر و ماده از یکدیگر، نمونه گیری از طریق سینوس شکمی صورت گرفته و ساختار همولنف جمع‌آوری شده با روش الکتروفورز و آنالیز FTIR تعیین گردید. فعالیت ضد باکتریایی پروتئین همولنف و همولنف میگوها بر علیه ۵ سویه باکتریایی پانوزن (ویبریولره، اشریشیا کلای، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، کلبسیلا پنومونه) در دوزهای ۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر به روش انتشار از دیسک مورد مطالعه قرار گرفت. در الگوی الکتروفوریک همولنف میگوهای نر و ماده حضور پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بین ۱۰۰-۲۲۰ KD مشاهده گردید. ساختار همولنف بر اساس آنالیز FTIR شامل ساختارهای منظم و نامنظم دوم پروتئینها است. تفاوت معنی‌داری بین پروتئین‌های همولنف در جنس نر و ماده در قدرت باکتری کشی آنها نسبت به سویه‌های مختلف مشاهده نشد ($P > 0/05$). غلظت‌های مختلف از همولنف، فعالیت‌های مهارتی متفاوتی را در سویه‌های باکتریایی نشان دادند. همچنین در میزان فعالیت ضد باکتریایی، اختلاف معنی‌داری بین همولنف جنس نر و جنس ماده مشاهده گردید ($P > 0/05$). بیشترین اثر مهارتی در همولنف جنس نر بر علیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و ویبریولره مشاهده شد. در صورتی که کمترین میزان فعالیت ضد باکتریایی را همولنف در جنس ماده بر علیه سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس و اشریشیا کلای با قطر عدم هاله رشد $5/9 \pm 0/12$ و $0/8 \pm 0/6$ میلی متر نشان داد. نتایج این تحقیق نشان دادند که همولنف میگوی آب شیرین از فعالیت ضد باکتریایی مناسبی برخوردار است و می‌تواند جایگزینی برای داروهای شیمیایی با خواص آنتی بیوتیکی باشد.

واژگان کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، همولنف، الکتروفورز، میگو، انتشار از دیسک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۰

مقدمه

مکانیسم دفاعی در سخت‌پوستان شامل مقاومت ذاتی (طبیعی)

* گروه بیولوژی دریایی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

(karimzadehkathy@yahoo.co.uk)

۱- بخش شیلات، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

فصل بهار (اردیبهشت) از تالاب انزلی به کمک تله تاشو صید گردید و به آزمایشگاه شیلات مرکز آموزش شیلات میرزاکوچک خان در رشت منتقل و در داخل تانک با هوادهی کامل نگهداری گردید.

جمع‌آوری همولنف

نمونه‌گیری توسط سرنگ انسولین با سر سوزن شماره ۲۶ از سینوس شکمی صورت گرفت (۴). نمونه‌های همولنف هر ۱۰ قطعه میگو به تفکیک جنسیت در میکروتیوب که حاوی بافر سیترات سدیم (جهت جلوگیری از انعقاد) با PH برابر ۴/۶ می‌باشد منتقل شدند. سانتریفیوز با دور 10 rpm هزار به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C انجام گرفت. مایع‌رویی جمع‌آوری شده و جهت آنالیزهای بعدی در درجه حرارت ۴°C قرار گرفت.

تخلیص پروتئین توسط روش ترسیب

پروتئین‌های همولنف توسط آمونیم سولفات ۷۵٪ ترسیب گردیدند و بعد از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C، در دور rpm 15000 به مدت ۲۰' در دمای ۴°C سانتریفیوز گردیده و رسوب حاصله در این مرحله توسط بافر استات 50 mM با PH ۵ به شکل سوسپانسیون ایجاد گردید (۸).

تهیه باکتری

کشت‌های خالص از باکتری‌های *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 465), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae*, (ATCC 10031) and *Vibrio cholerae* (ATCC14035) از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه و تا زمان مطالعه در دمای ملی یخچال نگهداری شد. روز قبل از انجام آزمایش، از کشت مادر، مقداری به محیط مولر هیتتون برات (muller-hinton- Broth) افزوده گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور نگهداری شدند باکتری‌ها با غلظت ۰/۵ مک فارلند (۸۱۰×۵/۱). توسط سواب کتان استریل به صورت چمنی در پلیت حاوی محیط کشت مولر هیتتون کشت داده شدند و پس از قرار دادن دیسک‌های استریل توسط پنس استریل شده بر روی پلیت‌ها با فاصله مناسب، ۲۰ μm از همولنف بر روی

همچنین فعالیت باکتری کشی هموسیت‌ها در برخی از سخت‌پوستان گزارش شده است (۲۹ و ۲۲، ۱۷). در خرچنگ ساحلی (*Carsinus maenas*) پروتئین‌های جدا شده با وزن مولکولی حدود ۶/۵ کیلو دالتون از همولنف با خاصیت ضدباکتریایی جدا شده است (۱۸). همچنین فعالیت ضدباکتری همولنف در بسیاری از سخت‌پوستان مانند خرچنگ آبی (8) (*Callinectes sapidus*) خرچنگ شنی (*Scylla Serrata*) (14) و نیز در جنس *Ocypodema crocora* (27) و *Carcinus maenas* مشخص شده است (۱۸) با وجود مطالعاتی که در سراسر جهان در خصوص خواص ضد میکروبی همولنف سخت‌پوستان انجام شده است، اطلاعات اندکی در ارتباط با فعالیت زیستی همولنف میگوی آب شیرین به ویژه در جنس‌های نر و ماده موجود می‌باشد. از جمله تحقیقاتی که بر روی همولنف میگوی آب شیرین انجام شده است می‌توان به مطالعه وانگ و همکاران (۲۸) اشاره کرد که ترادف ژنی ۵ فاکتور لیپوپلی ساکاریدی با خاصیت ضد باکتریایی در همولنف میگو آب شیرین تعیین شده است.

در سالهای اخیر با توجه به گسترش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها (پادزیست‌ها)، ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آنتی بیوتک افزایش یافته است، لذا یافتن ضد میکروبی از منابع طبیعی خشکی و دریایی ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به اینکه میگوی آب شیرین (*M. nipponense*) در بسیاری از رودخانه‌ها و تالاب‌های شمال شرق و غرب کشور حضور داشته و از جمعیت مناسبی نیز در تالاب انزلی، در سواحل جنوبی دریای خزر برخوردار است (۶)، بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی ساختار همولنف میگوی آب شیرین و نیز شناسایی اثر ضد باکتریایی همولنف در جنس‌های نر و ماده این میگو بر روی سویه‌های پاتوژن انسانی انجام گرفت.

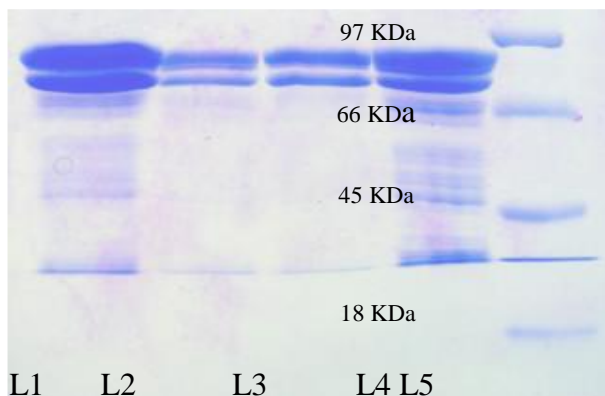
مواد و روش کار

در این مطالعه ۸۰ قطعه میگوی آب شیرین (*Macrobrachium nipponense*) ظاهراً سالم با طول تقریبی $12/0 \pm 1/8$ cm در

تخلیل آماری آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS17 انجام شد. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و جهت مقایسه بین تیمارها از آزمون توکی (دانکن) استفاده گردید.

نتایج

میزان پروتئین همولنف در جنس‌های نر و ماده میگوی آب شیرین برابر با $1/82 \pm 0/34$ و $1/58 \pm 0/12$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. الگوی الکتروفورز همولنف و پروتئین هر دو جنس میگو *M.nipponens* در نگاره ۱ آورده شده است. پروتئین‌های مختلفی با وزن مولکولی حدود ۱۸ تا ۹۰ کیلو دالتون براساس مارکر استاندارد قابل تشخیص هستند تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین الگوی الکتروفورز همولنف نر و ماده (L1 و L4) و پروتئین همولنف نر و ماده در الگوی الکتروفورز مشاهده نگردید اما میزان و تراکم باندها با وزن مولکولی ۷۰ تا ۹۰ کیلو دالتون در همولنف جنس نر قدری بیشتر از جنس ماده می‌باشد.



نگاره ۱- الگوی الکتروفورز همولنف و پروتئین‌های جنس نر و ماده میگوی رودخانه ای L1 : *M.nipponense* همولنف جنس نر L2 : پروتئین همولنف جنس نر L3 : پروتئین همولنف جنس ماده L4 : همولنف جنس ماده، L5 : مارکر پروتئینی با وزن مولکولی (۹۷،۶۶،۴۵،۱۸ کیلو دالتون)

با توجه به نتایج طیف FTIR حضور پیک‌ها در محدوده ۱۶۱۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر نشان دهنده در همولنف جنس نر و

دیسک‌ها ریخته شد دیسک‌های خام استریل به قطر ۶mm از غوطه‌وری در همولنف‌های جنس نر و ماده روی سطح محیط کشت حاوی باکتری قرار داده شد. از دیسک‌های آنتی بیوتیک جنتامایسین (ساخت شرکت ایران دارو) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۴ و ۱). پلیت‌ها به صورت وارونه در دمای 37°C - ۳۵ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند ناحیه مهار شد (هاله عدم رشد) باکتری توسط کولیس ورینه با دقت اندازه‌گیری شدند.

تعیین غلظت پروتئین

میزان پروتئین همولنف توسط روش Bradford به کمک استاندارد آلبومین گاوی تعیین گردید (۲).

الکتروفورز پلیاکریلامید

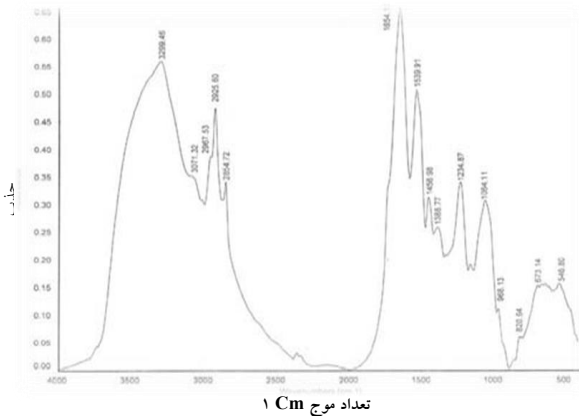
الکتروفورز پلیاکریل آمید همولنف و پروتئین‌های آن به روش Laemmli انجام گرفت. پس از تهیه ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲٪، نمونه‌های بر روی ژل برده شدند. الکتروفورز در حضور بافر تریس هیدروکلراید ۵۰mM (حاوی گلیسین ۲۰۰mM و SDS ۰/۱٪ با PH برابر ۸/۶) انجام گرفت. پس از اعمال ولتاژی معادل ۷۱۵۰V و شدت جریان ۲۰mA آمپر به مدت ۲ ساعت الکتروفورز به پایان رسیده و ژل حاصله از الکتروفورز توسط ماده رنگی کوماسی بلو R۳۵۰- رنگ‌آمیزی گردید.

طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز Fourier

Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR)

جهت تعیین ساختار و اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی در همولنف و پروتئین‌ها از طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده گردید. حدود ۵ml از نمونه همولنف با ۵۰ تا ۱۰۰ برمید پتاسیم خشک مخلوط گردید و پس از فشردن سازی و تهیه دیسک‌هایی با قطر ۱۰mm آماده‌سازی گردید. و به آزمایشگاه آنالیز دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تحویل داده شد تا مورد آنالیز قرار گیرد (۲۷).

تحلیل آماری



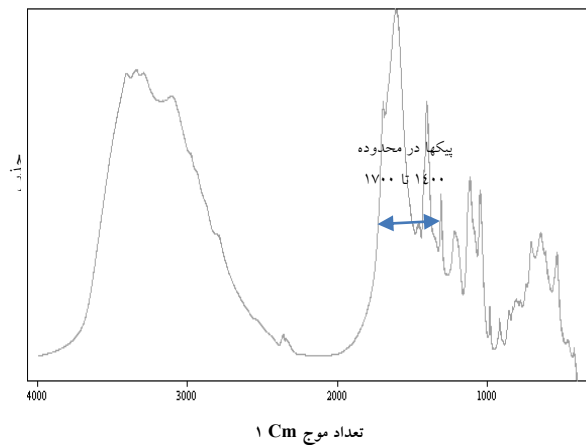
نگاره ۳- آنالیز FTIR پروتئین همولنف میگوی جنس ماده
Macrobrachium nipponense در ناحیه 1- 4000-400 Cm

میزان پروتئین همولنف در میگوی آب شیرین برابر با $1/58 \pm 0/12$ و $1/82 \pm 0/34$ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب در جنس نر و ماده مشاهده گردید.

اثرات ضدباکتری پروتئین همولنف و همولنف دو جنس نر و ماده میگو *M.nipponenes* با استفاده از آزمون انتشار از دیسک تعیین گردید که نتایج این آزمون در ادامه آورده شده است.

پروتئین‌های همولنف در هر دو جنس دارای هاله عدم رشد بزرگتری در برابر باکتری‌های ویبریولکره و اشیریشیا کلی، بودند و فعالیت ضد باکتریایی بیشتری نسبت به جتتامایسین نشان دادند ($P < 0/05$). کمترین هاله عدم رشد در سویه‌های باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده گردید. اختلاف معنی‌دار در سطح 0/5٪ بین هاله عدم رشد در همه باکتری‌ها در حضور پروتئین همولنف و شاهد بود (جدول ۱). تفاوت معنی‌داری بین پروتئین‌های همولنف جنس نر و ماده در قدرت باکتری کشی آنها نسبت به سویه‌های مختلف مشاهده نشد.

جنس ماده، حضور ساختارهای منظم و نامنظم دوم پروتئین‌ها در همولنف می‌باشد (نگاره ۲ و ۳). با توجه به گستردگی پیک در محدوده ۱۶۵۹ نانومتر احتمالاً بیش از ۳۵٪ این ساختار متعلق به ساختار آلفا هلیکس و پیک‌های محدوده ۱۶۲۳ و ۱۶۹۵ نانومتر (۲۲/۵٪) ساختار کنفورماسیون بتا را نشان می‌دهد. در محدوده ۱۶۴۰ ساختار نامنظم ماریچ‌های تصادفی نیز انتظار می‌رود. حضور پیک در محدوده ۳۰۰۰ تا ۳۴۶۰ نانومتر نشان دهنده پیوند کششی H-N مربوط به سولفانامید نوع دوم و کشش نامتقارن C-H در ساختار پروتئین می‌باشد. حضور پیک‌ها در محدوده‌های ۱۴۰۰ تا ۱۷۰۰، ۱۳۸۰ تا ۱۴۰۰، ۱۲۰۰ تا ۱۲۵۰، ۹۰۰ تا ۹۵۰ و ۸۱۰ تا ۸۸۰ نانومتر به ترتیب گروه‌های عملکردی C-H در ترکیبات آروماتیک، تری‌آزول، ترکیبات تیوفن، ترکیبات برم و سولفونیک اسید را نشان می‌دهد. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بین حضور پیک‌ها در همولنف جنس‌های نر و ماده مشاهده نشد.



نگاره ۲- آنالیز FTIR پروتئین همولنف جنس نر میگوی
Macrobrachium nipponense در ناحیه 1- 4000-400 Cm

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد پروتئین همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی و آنتی بیوتیک جتتامایسین بر علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

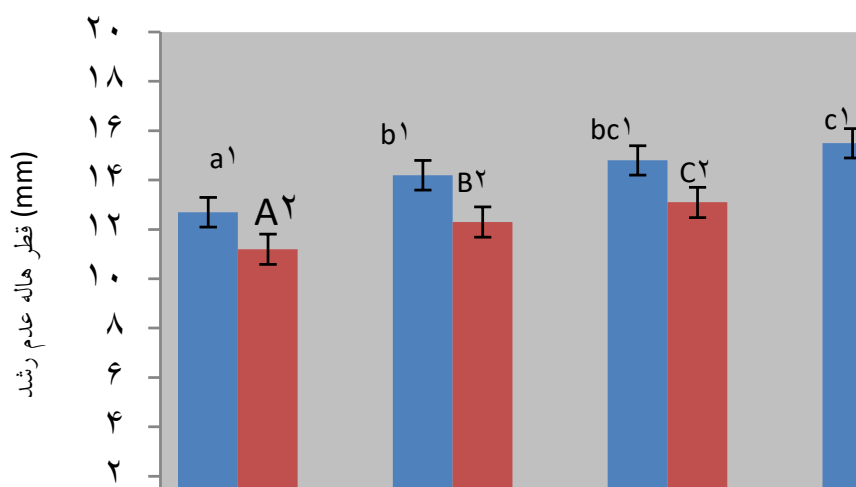
جتتامایسین ($10 \mu\text{g}/\text{disc}$)	پروتئین همولنف (جنس ماده) ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	پروتئین همولنف (جنس نر) ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	باکتری
$b11/0 \pm 15/25$	$aA7/0 \pm 28/34$	$aA7/0 \pm 17/2$	<i>S. aureus</i>
$b19/0 \pm 10/3$	$aA7/0 \pm 21/76$	$aA7/0 \pm 54/12$	<i>B. subtilis</i>
$a8/0 \pm 30/34$	$bB10/0 \pm 51/16$	$bB10/0 \pm 36/26$	<i>E.coli</i>

$b_{12} / 0 \pm 85 / 1$	$a_{A7} / 0 \pm 43 / 37$	$a_{A8} / 0 \pm 18 / 15$	<i>K. pneumoniae</i>
$b_{7} / 0 \pm 76 / 1$	$a_{B11} / 0 \pm 38 / 73$	$a_{B11} / 0 \pm 65 / 2$	<i>V. cholerae</i>

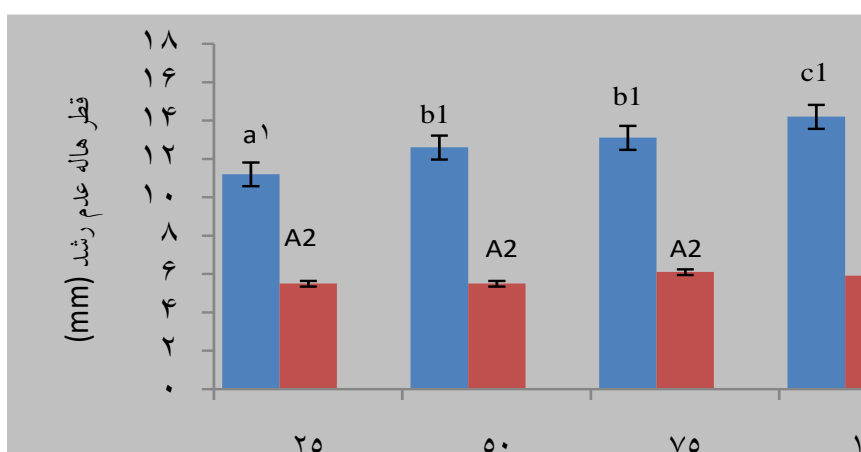
(حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است. حروف کوچک اختلاف در ردیف و حروف بزرگ اختلاف در ستون را نشان می‌دهد).

۲۵ میکروگرم در جنس ماده مشاهده گردید. این غلظت از همولف با سایر غلظت‌ها و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین داشت (نمودار ۱) ($P < 0/05$).

بیشترین اثر ضدباکتری در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۱۰۰ میکروگرم از همولف با قطر هاله عدم رشد $15/5 \pm 0/17$ میلی متر در جنس نر مشاهده گردید. کمترین قطر هاله عدم رشد ($11/2 \pm 0/04$) مربوط به غلظت



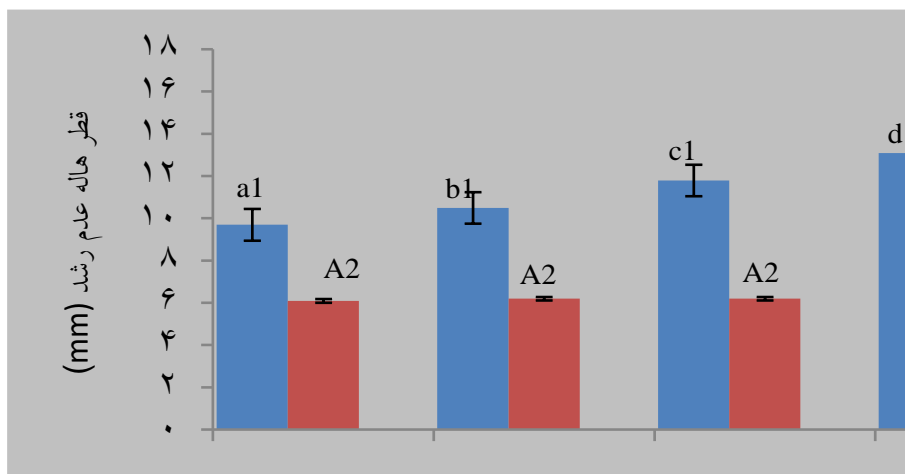
نمودار ۱- اثر ضد باکتری همولف جنس‌های نر و ماده میگو *M. nipponense* بر باکتری *Staphylococcus aureus*. اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار \pm میانگین). حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده (حروف کوچک در جنس نر و حروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمار می‌باشد.



نمودار ۲- اثر ضد باکتری همولف جنس‌های نر و ماده میگو *M. nipponense* بر باکتری *Bacillus Subtilis*. اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار \pm میانگین). حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده (حروف کوچک در جنس نر و حروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمار می‌باشد.

در باکتری گرم منفی اشرشیا کلی همولنف حاصله از جنس نر میگوی آب شیرین نسبت به همولنف جنس ماده اثر ضد باکتری بیشتری را نشان داد (نمودار ۳). اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت ضدباکتری بین غلظت‌های مختلف در همولنف جنس ماده مشاهده نگردید. ($P > 0/05$) اختلاف معنی‌داری بین آنتی بیوتیک‌های جتتامایسین با غلظت‌های مختلف از همولنف در دو جنس نر و ماده مشاهده گردید ($P < 0/05$).

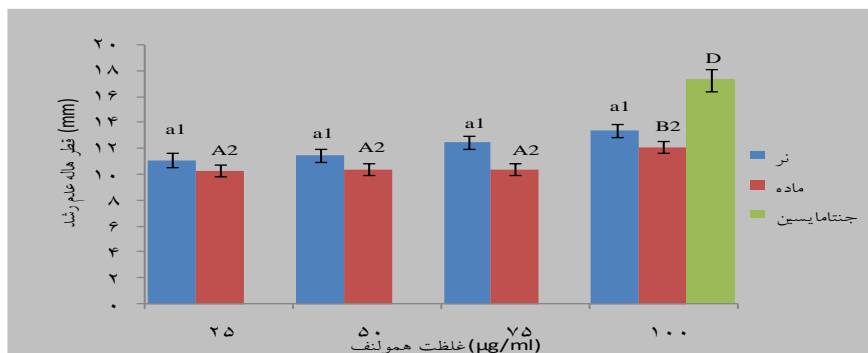
در باکتری گرم مثبت باسیلوس سابیتلیس، بیشترین اثر ضدباکتری در همولنف جنس نر با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($14/0 \pm 2/31 \text{ mm}$) و کمترین مقدار در همولنف جنس ماده در غلظت ۲۵ میکروگرم با قطر هاله عدم رشد $5/5 \text{ mm} \pm 0/32$ (نمودار ۲) در فعالیت ضد باکتریایی همولنف در دو جنس نر و ماده اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. ($P < 0/05$)



نمودار ۳- اثر ضد باکتری همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای *M. niponense* بر باکتری *Escherichia coli*.

اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار \pm میانگین)، حروف مختلف نماینده تفاوت

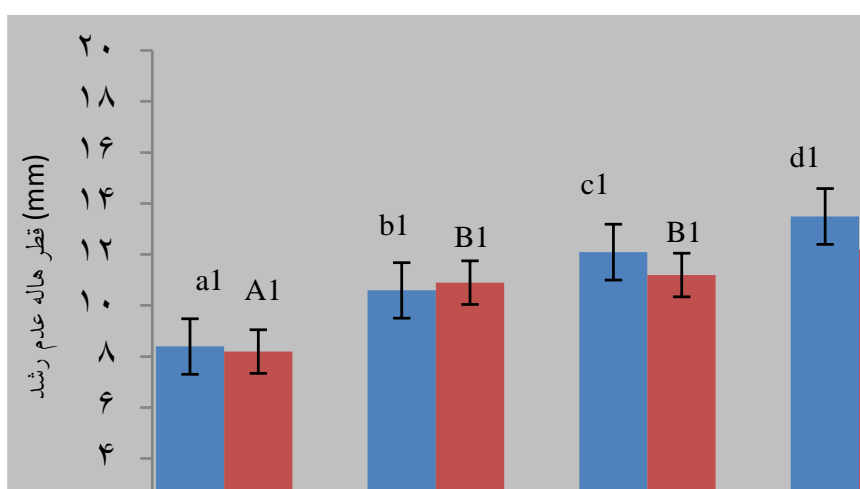
میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده (حروف کوچک در جنس نر و حروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیماری باشد.



نمودار ۴- اثر ضد باکتری همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای *M. niponense* بر باکتری *Kelbsila pneumonia* اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار \pm میانگین)، حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده (حروف کوچک در جنس نر و حروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان‌دهنده در اختلاف جنس‌های نر و ماده در هر تیمار می‌باشد.

در باکتری گرم منفی ویبریوکلره (نمودار ۵) بیشتری اثر ضدباکتری را غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر (۱۳/۰±۵/۱۴) همولف از خود نشان داد. اثر همولف در غلظت‌های مختلف روی این باکتری در دو جنس نر و ماده دارای اختلاف معنی داری بوده است ($P < ۰/۰۵$).

بیشترین اثر ضدباکتریایی همولف مربوط به جنس نر در باکتری کلبسیلا پنومونیه (نمودار ۴) مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. اختلاف معنی داری بین غلظت‌های مختلف همولف در هر دو جنس و نیز با آنتی بیوتیک‌ها مشاهده گردید. ($P < ۰/۰۵$) ولی تفاوت معنی داری بین غلظت‌های مختلف همولف از این حیث مشاهده نگردید ($P > ۰/۰۵$).



نمودار ۵- اثر ضد باکتری همولف جنس‌های نر و ماده میگوی *M. nipponense* بر باکتری *Vibrio cholerae* اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف (حروف کوچک در جنس نر و حروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان دهنده تفاوت در جنس‌های نر و ماده در هر تیماری باشد.

گونه *P. segnis* به ترتیب برابر با ۱۱/۸ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب در جنس نر و ماده گزارش شده است (۸). الگوی الکتروفورز همولف میگوی *M. nipponense* در هر دو جنس نر و ماده، حضور پپتیدهایی با وزن مولکولی ۱۸ kDa تا ۹۰ را نشان داد. وجود چنین پپتیدهایی در سایر مطالعات نیز تایید شده است (۷،۲۰). چنانکه پپتیدهایی با اوزان ۲۲ kDa، ۴۷، ۶۸، ۷۴، ۸۴ و ۹۱ در میگوی *M. rosenbergi* حضور ۲ باند پروتئین در هموسیت میگو *L. vanamei* با وزن ۷۳ kDa و ۷۵ شناسایی گردیده است (۲۰). در میگوهای خانواده پنانیده نیز حضور پپتیدها با خواص ضدباکتری در همولف با ۴۷ تا ۷۴ اسید آمینه، مشخص شده است که حضور این پپتیدها در میگوی بیری سیاه (۲۰) در *P. monodon* (۱۵) و در میگوهای

بحث

در سال‌های اخیر، توجه بسیاری به پژوهش و تحقیق در زمینه فعالیت زیستی تولیدات طبیعی دریایی و کاربرد دارویی و پزشکی آنها شده است. در مطالعه حاضر ساختار همولف میگوی *M. nipponense* و اثر ضدباکتریایی همولف در دو جنس نر و ماده این میگو مورد بررسی قرار گرفت.

میزان پروتئین همولف در جنس‌های نر و ماده میگوی آب شیرین برابر با ۱/۵۸±۰/۱۲ و ۱/۸۲±۰/۳۴ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. نتایج مشابهی در مقادیر پروتئین همولف در خرچنگ *D. dehaeni* (۱/۵، ۱/۶۵) میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب در جنس نر و ماده مشاهده گردید (۱۸). میزان پروتئین نیز در

فعالیت آنتی باکتری همولنف در گونه *C. clibanarius*. بر علیه باکتری ویبریو (*V. parahaemolyticus*) با قطر عدم هاله mm ۱۵/۱ مشاهده شده است (۱۶).

در بسیاری از مطالعات انجام شده در خصوص اثر همولنف بر روی ارگانسیم‌های پاتوژن، تاثیر بیشتر آنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری‌های گرم منفی گزارش شده است (۲۶ و ۲۰). علت این امر می‌تواند ناشی از حضور غشا خارجی (سد دفاعی) در باکتری‌های گرم منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزای هیدروفوبیک همولنف به لایه لیپو پلی ساکاریدی باکتری می‌شود (۲۶ و ۲۲).

در تحقیق حاضر اختلاف معنی‌داری در میزان مهار باکتریایی بر علیه برخی از سویه‌های پاتوژن در بین همولنف هر دو جنس میگو مشاهده شد. بطوریکه همولنف در جنس ماده میگوی *M. nipponense* فعالیت آنتی باکتریایی کمتری نسبت به جنس نر نشان داد. ساختار پپتیدهای ضد میکروبی در میان یک گونه و در شرایط زیستی یکسان تا حدود زیادی به شکل یکسانی حفظ شده است (۲۳، ۲۴، ۳۰) به طوریکه در مطالعه انجام شده بر فعالیت ضد باکتری در هموسیت‌های جمع‌آوری شده از دو جنس نر و ماده میگو *M. rosenbergi* با یک نوع شرایط زیست محیطی، تفاوتی در فعالیت‌های ضد باکتری آنها مشاهده نگردید (۲۰). اما برخی از پارامترها مانند جنسیت، شرایط غذایی، چرخه زندگی، بلوغ و اندازه گونه و حتی عوامل فیزیکی مانند درجه حرارت می‌تواند بر میزان پروتئین‌های یک گونه و نیز فعالیت آنتی باکتریایی آنها تاثیر بگذارد (۸، ۱۶).

تفاوت برون گونه‌ای نیز در مقدار نوع پروتئین‌ها در همولنف سخت‌پوستان مشاهده شده است. چنانکه در مطالعه انجام شده بر روی همولنف سخت‌پوستانی مانند *Charybdi lucifera*، خرچنگ ساحلی *Carcinus maenas* و خرچنگ‌های *barachyuran* تفاوت گسترده‌ای در مقدار پروتئین و فعالیت آنتی باکتریایی گزارش گردیده است (۲۴ و ۱۶).

L. setifeius، *L. vamamei* مشاهده شده است (۵) حضور پلی پپتیدهای با خاصیت ضد قارچی در پلاسمای میگو *P. vanama* با وزن مولکولی حدود ۲۷ kDa و پپتیدهایی با وزن‌های Da ۸۰/۴ تا ۸۳/۸ در میگوی *P. stylostris* مشاهده شد (۹).

از روش اسپکتوفتومتری FT-IR جهت شناسایی ترکیب و گروه‌های عاملی موجود در همولنف استفاده گردید. در طیف سنج مادون قرمز (FT-IR) همولنف *M. nipponense* حضور پیک در محدوده 1610 تا 1700 cm^{-1} که نشان دهنده ارتعاش کششی گروه آمید می‌باشد، به خوبی مشهود است. این ناحیه در استخراج همولنف از سایر سخت‌پوستان مانند خرچنگ *Clibanarius clibanarius* (۲۱) و خرچنگ *Ocyrode macrocera* نیز گزارش شده است (۲۳). این باند شامل ۸۰٪ ارتعاشات کششی $\text{C}=\text{O}$ که متصل به پیوند N-H خمشی داخل صفحه‌ای و کششی $\text{C}=\text{O}$ می‌باشد، که نشان دهنده ساختار دوم پروتئین‌ها است. در مطالعه حاضر با توجه به گستردگی پیک در محدوده 1659 cm^{-1} احتمالاً بیشترین درصد این ساختار متعلق به ساختار آلفا هلیکس و پیک‌های محدوده 1623 و 1695 cm^{-1} (۲۲/۵٪) ساختار کنفور ماسیون بتا را شامل می‌گردد (۲۳). حضور ترکیبات برم، سولفونیک اسید، تری آزول و تیوفن که در طیف FTIR همولنف میگوی آب شیرین مشاهده می‌شود می‌تواند خواص ضد باکتری همولنف را توجیه نماید (۲۳) چنان‌که فعالیت‌های دارویی و درمانی ترکیبات تری آزول در همولنف بسیاری از سخت‌پوستان گزارش شده است (۲۲).

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی باکتریایی بیشتری را همولنف میگوی *M. nipponenes* در هر دو جنس نر و ماده بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (با قطر هاله عدم رشد mm $5/17 \pm 0/5$ و mm $13/0 \pm 8/43$ به ترتیب) نسبت به سایر سویه‌های مورد مطالعه نشان دادند. فعالیت آنتی باکتریایی نسبتاً بالایی در همولنف و موکوس‌های جدا شده از خرچنگ *Bullacta exarata* بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی گزارش شده است (۲۶). بیشترین

- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Chisholm, J.R.S, Smith, V.J. (1992): Antibacterial activity in the hemocytes of the shore crab, *Carcinusmaenas*. *J. Mar Biol Assoc. U.K.* 72: 529-42.
- Chodsang, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Hara, K., Yoshida, A., Liang, X. (2012): Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn (*macrobrachiumrosenbergii*): characteristics and biochemical properties. *J. Food. Chem.* 134:351-8.
- Cuthbertson, B. J, Bullesbach, E.E., Gross, P.S. (2006): Discovery of synthetic penaeid in activity against antibiotic resistant. *Chem. Biol. Drug Des.* 68:120-7.
- De'Grave, S., Ghane, A. (2006) :The establishment of the Oriental River Prawn, *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849) in Anzali Lagoon, Iran. *Aquat. Invasions.* 1(4):204-208.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, V. A., Rodriguea, J., Bachere, E. (1997): Penaedine a new family or antimicrobial peptides isolated from the shrimp *penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*; 72: 28398-406.
- Hajirasouli, M., Pazooki, J. (2014) :Antimicrobial potential of haemolymph and hepatopancreas of *portunussegnis* crabs. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6(8): 601-603.
- Kawababa, S.I., Nagayama, R., Hirata, M., Shigenaga, T., Agarwala, K.L., Saito, T. (1996): Tachykinin, a small granular component in horseshore crab hemocytes is an antimicrobial protein with chitin-binding activity. *J. Biochem.* 120:1253-60.
- Kim, J.K., Kraemer G.P., Neefus, C.D, Chung. I.K., Yarish, C. (2007): Development and biological activities of marine derived bioactive peptides. *J. Funct. Foods.* 2(1): 1-9.
- Laemmle, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

در سخت‌پوستان، ترکیبات ضدباکتری پس از انجام پروسه‌هایی توسط گرانول‌های سیتوزولی در همولنف ذخیره می‌شوند و در زمانی که در معرض عفونت میکروبی قرار می‌گیرند به آزادسازی از همولنف آغاز می‌شود که در خرچنگ‌های *Callinectes sapidos* و *Carcinusmaenas* است (۲۰ و ۱۲).

مطالعه حاضر نشان داد که همولنف میگوی آب شیرین *M. nipponense* از قدرت ضدباکتری بیشتری نسبت به پروتئین همولنف برخوردار است. شاید دلیل این امر خصوصیات بافری و اجزای دیگر همولنف (غیر از پروتئین) در افزایش خاصیت باکتری کشی آن باشد. تفاوت مشاهده شده در قدرت باکتری کشی همولنف و پروتئین آن می‌تواند ناشی از سمیت ذاتی همولنف در سخت‌پوستان نسبت به باکتری‌ها باشد (۱۶).
سنجش میزان فعالیت ضدباکتری میگو *M. nipponense* می‌تواند اطلاعات پایه‌ای جهت مطالعه بیشتر در آینده را که همولنف این میگو قابلیت کاربری به عنوان ترکیب طبیعی با فعالیت‌های زیستی را دارد باشد. تحقیق و مطالعه در خصوص پپتیدهای همولنف می‌تواند زمینه را جهت شناسایی ترکیبات طبیعی با فعالیت دارویی جهت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها فراهم نماید به‌رحال تخلیص بیشتر ترکیبات طبیعی جهت بررسی ساختار شیمیایی و ارزیابی آنها به عنوان دارو ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان به جهت فراهم نمودن امکانات برای اجرای پروژه قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

- Baure, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, M.J.C., Turck, M. (1996): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 45:493-49.

14. Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y. (1998): Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesinII and polyphemisinI and II:chemical structures and biological activity. *J. Biochem.* 106:663-8.
15. Noga, E.J., Arroll, T.W., Fan, Z. (1996): Specificity and some physiochemical characteristics of the antibacterial activity from the blue crabs *Callinectes sapidus*. *Fish Shellfish Immunol.* 6(6):403-12.
16. Priya, E.R., Kohilam, Ravichandran S. (2015):Antimicrobial activity from the hemolymph of the hermit crab *Clibanarius clibanarius* (Herbst 1791). *World. J. Fish. Mar. Sci.* 7 (4): 263-267.
17. Rameshkumar, G.S., Ravichandran, M., Kaliyavarathan, G., Ajithkumar, T.T. (2009) :Antimicrobial peptide from the crab, *Thalassidroma (Latreille, 1829)*. *World J. Fish Mar Sci.* 1(2):74-9.
18. Rameshkumar, G., Aravindhan T., Ravichandran, S. (2009) :Antimicrobial proteins from the crab *Chrysochloris (Fabricius, 1798)*. *Middle East J of Sci Res.* 4(1):40-3.
19. Ravichandran, S.S., Wahidulla, L. D., Souza, Rameshkumar, G. (2010) Antimicrobial lipids from the hemolymph of brachyuran crabs. *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 162(4):1039-51.
20. Ravichandran, S., Jeyalakshmi, S., Sudha, S., Anbuhezian, R.(2010): Antimicrobial peptides from the haemolymph of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Bangladesh J Pharmacol.* 5: 62–67
21. Ravichandran, S., Sivasubramanian, K., Anbuhezian, R.M. (2010): Antimicrobial activity the hemolymph of crab *Ocypoda macrocera*. *J. Wor. Appl. Sci.* 11: 578-581
22. Smith V.J., Chisholm, J.R. (2001): Antimicrobial protein in crustaceans. *J. Adv. Exp. Med. Biol.* 484:95-112.
23. Soundrapandian, P. (2009): Nutritive value of hard and soft shell crabs of *Portunus sanguinolentus* (Herbst). *Int J Anim Vet Adv.* 1(2): 44-48.
24. Soundarapandian, P., Ananthan, G. (2008): Effect of unilateral eyestalk ablation and diets on the biochemical composition of commercially important juveniles of *Macrobrachium malcomsonii* (H. Milne Edwards). *Int. J. Zool. Res.* 4(2): 106-112.
25. Stewart, J. E., Zwicker, B. M. (1972): Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster; *Homarus americanus*: products of hemocyte-plasma interactions. *Can. J. Microbiol.* 18:1499–1509.
26. Tincu, J.A., Taylor, S.W. (2004): Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(10): 3645-3654.
27. Veeruraj, A., Ravichandran, S., Rameshkumar, G. (2008): Antibacterial activity of crab hemolymph on clinical pathogens. *J Trend in Applied Sci Res.* 3: 174-81.
28. Wang, Y., Tang, T., Gu, J., Li, X., Yang, X., Gao, X., Liu, F., Wang, J. (2015): Identification of five anti-lipopolysaccharide factors in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunol.* 46(2): 252–260.
29. Youqin, K., Liqiao, C., Zhili, D. (2016): Molecular cloning, characterization, and mRNA expression of hemocyanin Subunit in Oriental River Prawn *Macrobrachium nipponense*. *Int. J. Genomics.* 13: 6404817.
30. Zhao, D., Song, S., Wang, Q., Zhang, X., Hu, S., Chen, L. (2009): Discovery of immune-related genes in chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by expressed sequence tag analysis of haemocytes,” *Aquaculture.* 287(3-4): 297–303.