



تغییرات فصلی در پروفیل پروتئین موکوس و ساختار اپیدرم پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* در طی مراحل مختلف پرورش

مرضیه ابوالفتحی^۱، آرش اکبرزاده^{۲*}، عبدالمجید حاجی‌مرادلو^۳، حمیدرضا جوشقانی^۴

^۱ دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران

^۲ دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

^۳ استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۴ دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر اندازه و فصل بر پروفیل پروتئین موکوس و ساختار اپیدرم پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. نمونه‌های موکوس و پوست در طی سه فصل متوالی شامل اواخر زمستان (اسفند)، اواسط بهار (اردیبهشت) و اوایل پاییز (مهر) در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ تهیه شدند. در هر فصل، ۱۰ ماهی از چهار گروه وزنی شامل ۲۰-۲ گرم (W_1)، ۲۰۰-۱۰۰ گرم (W_2) و ۶۰۰-۴۰۰ گرم (W_3) به‌طور تصادفی صید و از پوست و موکوس آنها نمونه‌برداری شد. نتایج آنالیزهای بافت‌شناسی نشان داد که تراکم سلول‌های جامی شکل و ضخامت اپیدرم پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان با افزایش دما از فصل زمستان تا فصل پاییز در همه گروه‌های وزنی افزایش یافت ($p < 0/05$). اندازه سلول‌های جامی شکل در بچه‌ماهی‌ها (W_1) تحت تأثیر فصل نبود ($p > 0/05$)، درحالی‌که بین اندازه ماهی و تراکم سلول‌های جامی شکل نیز یک ارتباط مثبت و معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0/05$). آنالیز بیوشیمیایی موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که همزمان با افزایش تراکم سلول‌های جامی شکل در فصل بهار غلظت پروتئین محلول موکوس نیز در هر سه گروه وزنی مورد مطالعه افزایش یافت ($p < 0/05$). پروفیل پروتئین موکوس قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز اختلاف فصلی در هر سه گروه وزنی نشان داد. در پاییز، پروتئین‌های با وزن مولکولی کمتر از ۳۵ کیلو دالتون غالب بودند، درحالی‌که در زمستان این پروتئین‌ها مشاهده نشدند ($p < 0/05$). پروفیل پروتئین موکوس بین گروه‌های وزنی مختلف تقریباً مشابه بود ($p > 0/05$).

واژه‌های کلیدی:

سلول‌های جامی شکل، ضخامت اپیدرم، پروتئین محلول، الکتروفورز

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۶/۱۰/۲۶

پذیرش: ۹۶/۱۱/۰۹

DOI: 10.22034/ja.ir.9.2.21

نویسنده مسئول مکاتبات:

آرش اکبرزاده، دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

ایمیل: akbarzadeh@ut.ac.ir

۱ | مقدمه

در محیط‌های آبی، ماهی‌ها در تماس مستقیم با طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا می‌باشند. از طرف دیگر در سیستم‌های پرورش متراکم، ماهی ممکن است در معرض شرایط استرس‌زای فراتر از ظرفیت تحمل خود از جمله دمای آب بالاتر، تراکم بالا یا کمبود مواد غذایی قرار گیرد که منجر به تضعیف سیستم ایمنی و در نتیجه افزایش حساسیت به عفونت‌های میکروبی می‌شود (Vadstein, 1997). بنابراین ماهی به مکانیزم‌های دفاعی قوی نیاز دارد تا بتواند بقای خود را در چنین سیستمی حفظ کند. در مهره‌داران رده پایین‌تر از جمله ماهیان استخوانی، سیستم ایمنی اختصاصی از جمله آنتی-بادی‌ها و پاسخ‌های سلولی اختصاصی پیچیدگی کمتری نسبت به مهره‌داران رده بالاتر دارند. از طرف دیگر سیستم ایمنی اکتسابی ماهی

در مراحل لاروی و یا در دمای پایین کارایی کمتری دارد (Tsutsui et al., 2006)، به عبارت دیگر مکانسیم دفاع اختصاصی در ماهی کند و وابسته به دما می‌باشد. به عنوان مثال گونه‌های مناطق معتدله مانند آزادماهیان به حداقل ۶-۴ هفته و گونه‌های مناطق سردسیری مانند روغن‌ماهی (*Gadus morhua*) به ۱۲-۱۰ هفته نیاز دارند تا پاسخ ایمنی اختصاصی را نشان دهند. بنابراین به نظر می‌رسد ماهی‌ها برای حفاظت در مقابل هجوم عوامل بیماری‌زا بیشتر به مکانسیم‌های ایمنی غیراختصاصی که سریع فعال شده و مستقل از دما است، متکی می‌باشند (Magnadottir et al., 2001; Ellis, 2001).

ساختار پوست ماهی خصوصاً ماهیان استخوانی عالی منحصر به فرد است. از لحاظ بافت‌شناسی (Fast et al., 2002) با پوست پستانداران

محیط است می‌تواند اطلاعات برای مدیریت و کاهش خطر بیماری در آبی‌پروری را افزایش دهد. ترشح موکوس در بسیاری از مطالعات از طریق تغییر تعداد سلول‌های جامی شکل یا ویژگی‌های رنگ‌آمیزی در مشاهدات هیستولوژی یا هیستوشیمیایی تخمین زده می‌شود (Dezfuli et al., 2002; Buchmann et al., 2004). به‌عنوان مثال، تراکم سلول‌های موکوسی پوست بچه‌ماهی سالمون آتلانتیک و در نتیجه میزان ترشح موکوس در طی زمستان (نوامبر- فوریه) کاهش یافت (Wilkins and Jancsar, 1979). مطالعه بافت‌شناسی ساختار اپیدرم پوست ماهی و ترکیب موکوس در طی مراحل مختلف زندگی به درک فرآیند توسعه پوست و همچنین در تشخیص و درمان بیماری‌های پوستی ماهی کمک خواهد کرد. قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از رایج‌ترین ماهی‌های پرورشی آب شیرین در سیستم‌های متراکم ایران می‌باشد. این ماهی مانند اغلب گونه‌های پرورشی، اختلاف زیادی را در دمای آب در طی دوره پرورش تجربه می‌کند. به عنوان مثال در تابستان دمای آب به حدود ۲۱-۱۸ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد، درحالی‌که در زمستان ماهی دمای حدود ۹-۵ درجه سانتی‌گراد را نیز تحمل می‌کند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تاثیر فصل بر پروفیل پروتئین موکوس و ساختار اپیدرم پوست ماهی قزل‌آلای رنگین در مراحل مختلف پرورش می‌باشد. آنالیزهای بافت-شناسی شامل اندازه‌گیری ضخامت اپیدرم، تعداد و اندازه سلول‌های جامی شکل می‌باشد.

۲ | مواد و روش‌ها

این آزمایش در کارگاه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان واقع در روستای فاضل‌آباد گرگان انجام شد. نمونه‌های موکوس و پوست در طی سه فصل متوالی شامل اواخر زمستان (اسفند)، اواسط بهار (اردیبهشت) و اوایل پاییز (مهر) در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ تهیه شدند. در هر فصل، نمونه‌گیری به‌طور مجزا از چهار گروه وزنی شامل ۲۰-۲ گرم (W_1)، ۲۰۰-۱۰۰ گرم (W_2) و ۶۰۰-۴۰۰ گرم (W_3) انجام شد. همچنین لازم به ذکر است که دمای آب از ۹ درجه سانتی‌گراد در زمستان به ۱۶ درجه سانتی‌گراد در پاییز افزایش یافت.

جمع‌آوری موکوس مطابق با روش راس و همکاران (Ross et al., 2004) با اندکی تغییر انجام شد. پس از مشاهده وضعیت عمومی هر ماهی و اطمینان از سالم بودن آن‌ها، ۱۰ ماهی از هر گروه وزنی به‌طور تصادفی انتخاب و با استفاده از محلول گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیهوش و به کیسه‌های پلی‌اتیلنی حاوی ۱۰ سی سی بافر فسفات سدیم (PBS, 40 Mm, pH=7.4, 50 Mm NaCl) منتقل شدند. کیسه‌ها به آرامی به مدت ۲-۱ دقیقه به‌منظور جمع‌آوری موکوس تکان و سپس به تانک‌های بازبایی برگردانده شدند. نمونه‌های موکوس برای انتقال به آزمایشگاه بلافاصله به تانک ازت منتقل شدند.

بعد از انجماد زدایی، نمونه‌ها هم‌وزن شدند و سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۲۸۶۰ سانتریفوژ (مدل 5810R eppendorf centrifuge) شدند. سوپرناتانت حاصل به آرامی جمع‌آوری شده و بعد از انجماد در دمای ۸۰- درجه

بسیار متفاوت بوده و قادر به ترشح موکوسی است که به عنوان جزء اصلی در سیستم ایمنی ذاتی ماهی محسوب می‌شود (Salinas et al., 2011). اپی‌تلیوم پوست مهره‌داران خشک‌زی کراتینه بوده و به‌عنوان یک سد موثر در مقابل عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند. اما علی‌رغم این حقیقت که ماهی در محیط آبی به‌طور مداوم در معرض یک طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا قرار دارد، اپی‌تلیوم پوست آن به میزان کمی کراتینه بوده و قادر به دریافت آنتی ژن‌های محیطی می‌باشد (Moore et al., 1998). بنابراین به‌منظور جلوگیری از تشکیل کلونی توسط باکتری و سایر عوامل بیماری‌زا ایمنی موکوسی خصوصاً برای ماهی دارای اهمیت می‌باشد. موکوس اپیدرم توسط سلول‌های جامی شکل ترشح و متشکل از آب و گلیکوپروتئین‌های با وزن مولکولی بالا می‌باشد. موکوس به‌عنوان یک جزء از مکانیزیم ایمنی ذاتی دارای نقش دوگانه‌ای می‌باشد. با تولید و ترشح مداوم از تشکیل کلونی توسط انگل‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها روی سطح بدن جلوگیری می‌کند، همچنین موکوس حاوی فاکتورهای ایمنی ذاتی از جمله لیزوزیم، فلاوازنزیم‌ها، اینترفرون، ویتلوتینین، ایمونوگلوبولین‌ها، کربنیک‌آنهیدراز، کالمودولین، پروتئین‌های مکمل، پروتئین‌های فاز حاد، آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی دیگر می‌باشد که به‌طور مداوم بیان شده تا از ماهی در مقابل پاتوژن‌ها حفاظت کند (Nigam et al., 2012; De Veer et al., 2007; Ellis, 2001). ترکیب موکوس پوست ماهی بسیار متغیر می‌باشد. مطالعات متعددی اثبات کرده‌اند که وجود و فعالیت فاکتورهای ایمنی در موکوس پوست به شرایط فیزیولوژیکی و اکولوژیکی از جمله شوری، pH، استرس دستکاری، مراحل تکاملی و سیکل فصلی بستگی دارد (Lebedeva, 2010; Subramanian et al., 2008; Magnadottir et al., 1999). دما، محرک فصلی اصلی تغییر در پاسخ ایمنی بسیاری از گونه‌های ماهی است که هر دو سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. مطالعات متعددی حساسیت دمایی سیستم ایمنی اختصاصی را گزارش کرده‌اند (Clem and Bly, 1992; Stolen et al., 1984; Le Morvan et al., 1998). درحالی‌که اطلاعات محدودی در مورد تأثیر دما یا فصل بر ایمنی ذاتی وجود دارد. از طرف دیگر تمرکز مطالعات اولیه روی سیستم ایمنی ذاتی خون می‌باشد، اما درحال حاضر تمایل زیادی برای مطالعه موکوس ماهی به‌عنوان یک تکنیک غیرتهاجمی وجود دارد. به‌عنوان مثال فاگان و همکاران (Fagan et al., 2003) در مطالعه پروفیل پروتئین موکوس پوست سالمون آتلانتیک دریافتند که تراکم پروتئین‌های ضد میکروبی در ناحیه ۳۰ کیلودالتون در طی زمستان تا بهار کاهش یافت، درحالی‌که تراکم باندهای ۱۴/۵ کیلودالتون (لیزوزیم) در طی این دوره افزایش یافت. چنین اطلاعاتی برای درک فصل‌پذیری در بیماری و تعیین زمان مناسب دستکاری، انتقال یا واکسیناسیون و استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی مفید می‌باشد (Bowden et al., 2007).

اختلاف در ترکیب شیمیایی موکوس و نحوه ارتباط آن‌ها با ساختار لایه اپیدرم ممکن است در ارتباط با تفاوت مشاهده شده در مقاومت به بیماری باشد. بنابراین مطالعه عمیق این لایه که مانع حفاظتی در مقابل

سپس با استفاده از میکروتوم برش‌های ۵ میکرونی از بافت تهیه و با روش معمول رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین رنگ‌آمیزی شدند. مواد موکوسی با استفاده از رنگ‌آمیزی PAS اثبات شدند. جهت مطالعات بافت‌شناسی، پنج برش بافتی از هر نمونه انتخاب و در هر برش حداقل پنج میدان دید میکروسکوپی با عدسی شیئی ۴۰× برای اندازه‌گیری ضخامت اپیدرم، تراکم و اندازه سلول‌های موکوس استفاده شد. برای مطالعات بافت‌شناسی از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین Olympus DP72 و نرم‌افزار Dino Capture-1 استفاده گردید. تراکم سلول‌های جامی شکل به‌عنوان تعداد سلول‌های جامی‌شکل در هر ۱۰۰ میکرومتر از طول اپیدرم بیان شد. برای محاسبه ضخامت اپیدرم و اندازه سلول‌های جامی شکل از نرم‌افزار Digimizer-4.1.1.0 با تعریف مقیاس برای عکس‌های موردنظر استفاده شد (Fast et al., 2002).

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، اثر فصل و اندازه ماهی به‌طور مجزا به‌کمک نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA- one way) انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Multiple- range test Duncans) در سطح اطمینان $\alpha = 0.05$ استفاده شد.

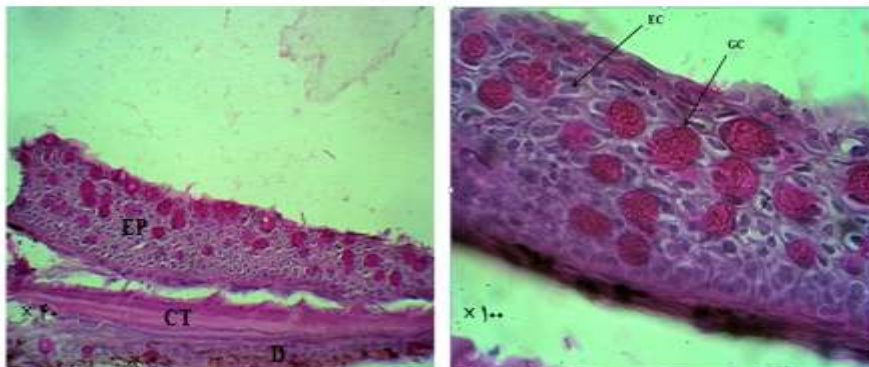
۳ | نتایج

سلول‌های جامی شکل در رنگ‌آمیزی PAS به رنگ قرمز بوده و توسط اندازه بزرگ و تجمع گرانول‌های ترشحی در آن از سلول‌های اپیتلیال قابل تشخیص بودند (شکل ۱). سلول‌های جامی شکل در لایه میانی تا سطحی در حد فاصل سلول‌های اپیتلیوم نواحی مختلف پوست شامل ناحیه دم، سر، نواحی پشتی و شکمی مشاهده شدند. هر چند تراکم این سلول‌ها در ناحیه شکمی به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر نواحی دیگر بود ($p < 0.05$).

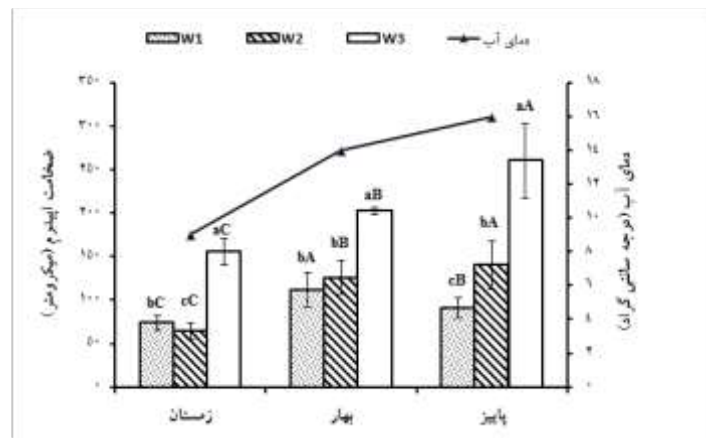
سانتی‌گرا لایوفیلیزه شدند. پودر موکوس لیوفیلیزه‌شده مجدداً در بافر فسفات حل (غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر) و پروتئین‌های نامحلول با سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گرا در دور ۲۸۶۰ g جدا و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

غلظت پروتئین موکوس هر ماهی با استفاده از روش لاوری (Lowry, 1951) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه‌گیری شد. پروفیل پروتئین نمونه‌های موکوس با استفاده از تکنیک الکتروفورز ژل سدیم دو دوسیل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) مطابق با روش لاملی (Laemmli, 1997) به‌طور کیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمونه‌های موکوس به نسبت ۱:۲ با بافر نمونه (SDS 4%, 50 Mm Tris-Hcl, مرکاپتواتانول ۲٪، گلیسرول ۱۲٪ و بروموفنول بلو ۵٪، pH= 6/8) رقیق و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گرا جوشانده و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ شدند. نمونه‌ها با استفاده از ژل آکریل آمید ۱۵ درصد تحت ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه لود شدند. بعد از لود شدن پروتئین‌های موکوس، ژل‌ها با استفاده از محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بریلینت‌بلو (کوماسی‌بلو ۲۵٪، در متانول ۲۵٪ و استیک اسید گلاسیال ۱۰٪) به مدت ۴۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس با استفاده از محلول رنگ بر اسید استیک گلاسیال ۷/۵٪ در متانول ۵۰٪ رنگ‌زدایی شدند. از نرم افزار توتال - لب و با استفاده از مارکرهای با وزن مولکولی بالا (۲۴۵-۵ کیلو دالتون) برای برآورد وزن مولکولی پروتئین‌های موکوس استفاده شد.

در هر فصل ۵ ماهی از هر گروه وزنی به‌طور تصادفی انتخاب شدند. پس از بررسی ماکروسکوپی ماهی (فرم بدن، رنگ و وضعیت پوست نواحی مختلف بدن) از پوست نواحی مختلف بدن شامل سر، نواحی پشتی (زیر باله‌پشتی)، شکمی و دم نمونه‌هایی به ضخامت حداکثر ۵ میلی‌متر تهیه گردید. نمونه‌ها در بافر فرمالین خنثی ۱۰ درصد فیکس و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها با استفاده از یک مجموعه استاندارد الکل ۱۰۰ درصد آب‌زدایی و در پارافین قالب‌گیری شدند.



شکل ۱- ساختار اپیدرم پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان - رنگ‌آمیزی PAS - اپیدرم (EP)، بافت پیوندی (CT)، درم (D)، سلول‌های جامی شکل (GC)، سلول‌های اپی‌تلیال (EC)



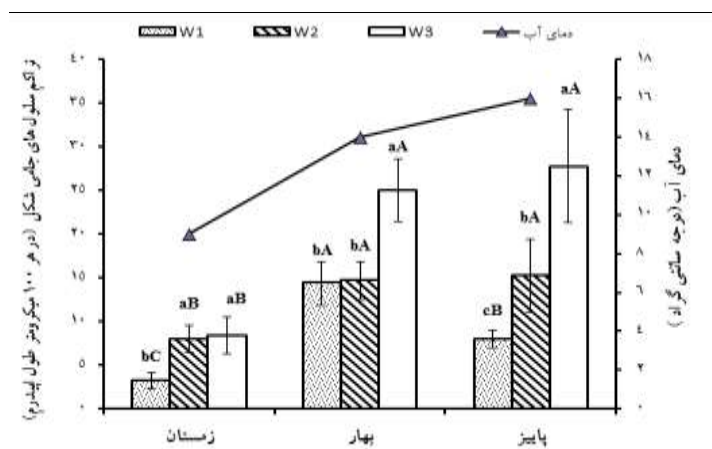
شکل ۲- ضخامت اپیدرم پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی فصول مختلف. ماهی ۲۰-۲۰ گرم (W_1)، ماهی ۱۰۰-۲۰۰ گرم (W_2)، ماهی ۴۰۰-۶۰۰ گرم (W_3). تأثیر اندازه ماهی و فصل به ترتیب با حروف معنی‌داری کوچک و بزرگ نشان داده شده است. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

با افزایش دما از فصل زمستان تا بهار تراکم سلول‌های جامی شکل در هر سه گروه وزنی افزایش یافت ($p < 0/05$) (شکل ۳). اما روند این تغییرات از بهار تا پاییز در گروه‌های وزنی مختلف متفاوت بود. در بچه- ماهی‌ها (W_1)، تراکم سلول‌های جامی شکل در پاییز مجدداً کاهش یافت اما میزان آن همچنان بالاتر از زمستان بود ($p < 0/05$)، در حالی که ماهی‌های بزرگتر W_2 و W_3 ، اختلاف معنی‌داری را در تراکم سلول- های جامی شکل در طی بهار تا پاییز نشان ندادند ($p > 0/05$).

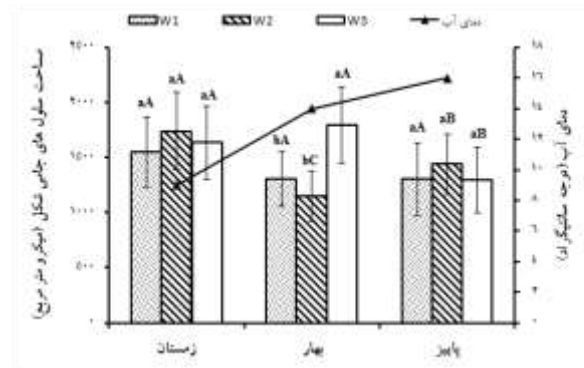
در بچه‌ماهی‌ها W_1 ، فصل تأثیری بر اندازه سلول‌های جامی شکل نداشت ($p > 0/05$). در ماهی‌های بزرگتر W_2 ، اندازه این سلول‌ها با افزایش دما در فصل بهار کاهش و در پاییز مجدداً افزایش یافت و به ۸۰ درصد میزان آن در زمستان رسید ($p < 0/05$). اندازه سلول‌های جامی شکل در گروه وزنی W_3 با افزایش دما در بهار تغییر معنی‌داری نکرد ($p > 0/05$)، اما در پاییز میزان آن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$) (شکل‌های ۴ و ۵).

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده می‌شود، ضخامت اپیدرم پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر هر دو عامل اندازه ماهی و فصل قرار گرفت. به‌طوری‌که با افزایش اندازه ماهی، ضخامت اپیدرم در هر سه فصل مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$). هم- چنین با افزایش دما از فصل زمستان (۹ درجه سانتی‌گراد) تا پاییز (۱۶ درجه سانتی‌گراد) ضخامت اپیدرم در گروه‌های وزنی W_2 و W_3 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$). در بچه‌ماهی‌ها (W_1) با افزایش دما از فصل زمستان تا بهار، ضخامت اپیدرم ابتدا افزایش و در فصل پاییز مجدداً کاهش یافت، اما همچنان بالاتر از میزان آن در فصل زمستان بود (شکل ۲).

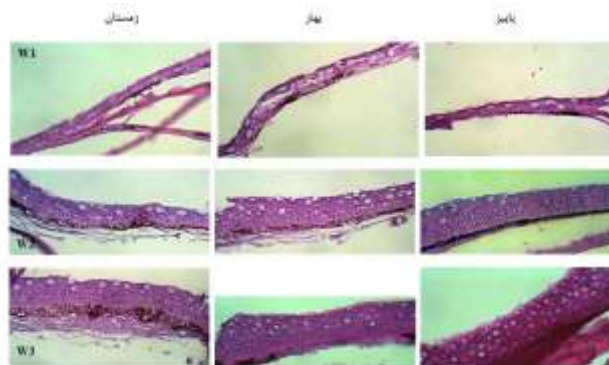
بالاترین تعداد سلول‌های جامی شکل در اپیدرم ماهیان بزرگتر (W_3) مشاهده شد ($p < 0/05$)، هر چند در فصل زمستان بین گروه‌های وزنی W_2 و W_3 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0/05$) (شکل ۳). اما اندازه ماهی تأثیری بر اندازه این سلول‌ها نداشت ($p > 0/05$)، به جز در فصل بهار که بزرگترین سلول‌های جامی شکل در ماهی‌های بزرگتر W_3 مشاهده شد ($p < 0/05$) (شکل ۴).



شکل ۳- تراکم سلول‌های جامی شکل اپیدرم پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی فصول مختلف. ماهی ۲۰-۲۰ گرم (W_1)، ماهی ۱۰۰-۲۰۰ گرم (W_2)، ماهی ۴۰۰-۶۰۰ گرم (W_3). تأثیر اندازه ماهی و فصل به ترتیب با حروف معنی‌داری کوچک و بزرگ نشان داده شده است. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).



شکل ۴- اندازه سلول‌های جامی شکل اپیدرم پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی فصول مختلف. ماهی ۲۰-۲۵ گرم (W₁)، ماهی ۱۰۰-۲۰۰ گرم (W₂)، ماهی ۴۰۰-۶۰۰ گرم (W₃)، تأثیر اندازه ماهی و فصل به ترتیب با حروف معنی‌داری کوچک و بزرگ نشان داده شده است. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

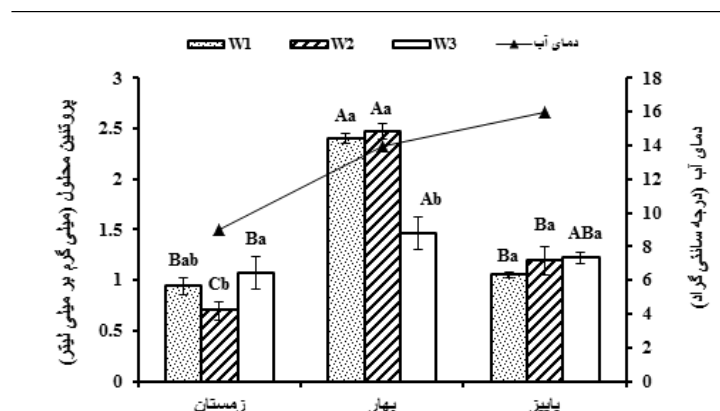


شکل ۵- آنالیز بافت‌شناسی اپیدرم پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی فصول مختلف- تراکم سلول‌های جامی شکل از فصل زمستان تا پاییز افزایش یافت. ماهی ۲۰-۲۵ گرم (W₁)، ماهی ۱۰۰-۲۰۰ گرم (W₂)، ماهی ۴۰۰-۶۰۰ گرم (W₃) رنگ آمیزی H&E- بزرگنمایی ۴۰ $\times$.

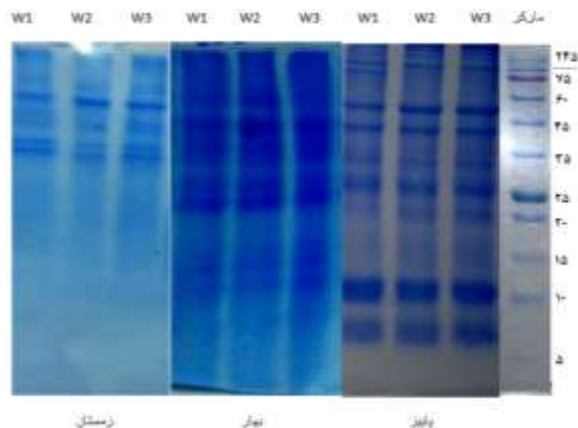
وزن مولکولی کمتر از ۷ کیلودالتون تا ۲۶۹ کیلودالتون را در موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد. اختلاف معنی‌داری بین پروفیل پروتئین موکوس در فصول مختلف مشاهده شد. در پاییز، پروتئین‌های کوچک با وزن مولکولی کمتر از ۳۵ کیلودالتون غالب بودند، در حالی که تراکم پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا در زمستان بیشتر بود. همچنین یک باند جدید با وزن مولکولی ۷ کیلودالتون فقط در فصل پاییز مشاهده شد. پروفیل پروتئین گروه‌های وزنی مختلف مشابه بود (شکل‌های ۷-۸).

در تمام گروه‌های وزنی، غلظت پروتئین موکوس به‌طور معنی‌داری از زمستان تا بهار افزایش و سپس در پاییز کاهش یافت ($p < 0.05$). در فصل بهار، غلظت پروتئین در گروه‌های وزنی W₁ و W₂ به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه وزنی W₃ بود، در حالی که در فصل زمستان، بالاترین غلظت پروتئین محلول مربوط به ماهی W₃ بود ($p < 0.05$). اما اندازه ماهی تأثیر معنی‌داری بر غلظت پروتئین در فصل پاییز نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۶).

نتایج آنالیز SDS-PAGE رنج وسیعی از پروتئین‌ها و پپتیدهایی با



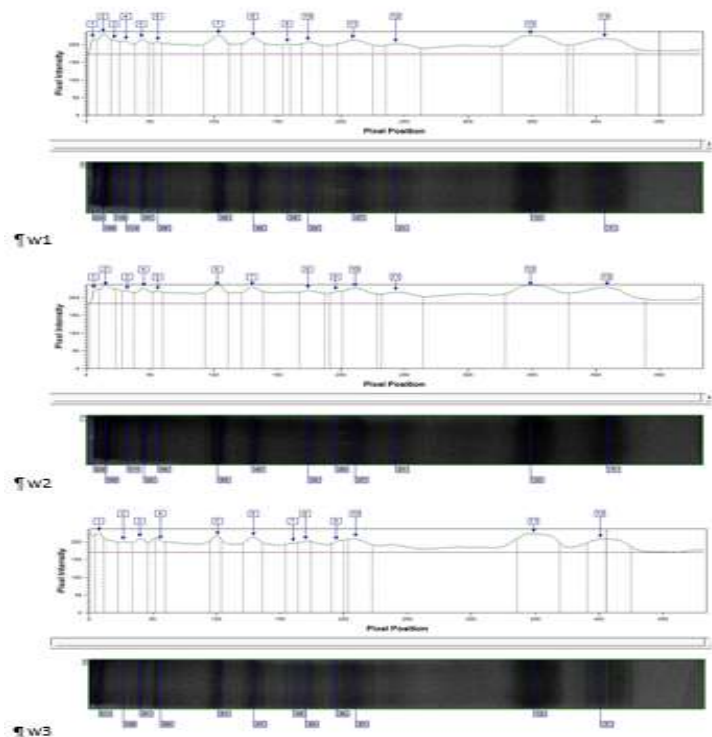
شکل ۶- غلظت پروتئین موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی فصول مختلف. ماهی ۲۰-۲۵ گرم (W₁)، ماهی ۱۰۰-۲۰۰ گرم (W₂)، ماهی ۴۰۰-۶۰۰ گرم (W₃)، تأثیر اندازه ماهی و فصل به ترتیب با حروف معنی‌داری کوچک و بزرگ نشان داده شده است. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).



شکل ۷- پروفیل پروتئین موکوس پوست قزل‌آلای رنگین در طی فصول مختلف

جدول ۱- وزن مولکولی باندهای پروتئین موکوس پوست قزل‌آلای رنگین کمان در طی فصول مختلف با استفاده از نرم‌افزار توتال لب

زمستان			بهار			پاییز		
W1	W2	W3	W1	W2	W3	W1	W2	W3
۸۹	۹۱	۸۵	۵۳	۵۳	۵۴	۲۱۱	۲۲۴	۲۲۰
۶۳	۶۲	۶۲	۴۲	۴۲	۴۱	۱۸۱	۱۸۹	۱۸۰
۵۵	۵۳	۵۲	۳۷	۳۷	۳۷	۸۵	۱۱۴	۱۱۱
۳۸	۳۹	۴۰	۳۳	۳۳	۳۳	۶۹	۸۵	۸۲
۳۵	۳۵	۳۵	۲۶	۲۷	۲۶	۵۰	۶۹	۶۹
۳۳	۳۲	۳۳	۲۴	۲۳	۲۲	۴۱	۵۰	۵۰
			۱۷	۱۷	۱۷	۳۵	۴۰	۴۰
			۱۶	۱۵	۱۶	۳۳	۳۵	۳۳
			۱۲	۱۲	۱۲	۳۰	۳۳	۲۹
						۲۷	۲۷	۲۷
						۱۲	۲۱	۲۱
						۷	۱۲	۱۲
							۷	۷



شکل ۹- الگوی باندهای پروتئین موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در فصل بهار با استفاده از نرم‌افزار توتال لب

۴ | بحث و نتیجه گیری

به طور کلی پوست ماهیان استخوانی به سه لایه اپیدرم، درم و لایه مخاطی تقسیم می شود. اپیدرم نیز شامل سه لایه سطحی، میانی و قاعده‌ای می باشد. لایه سطحی، یک لایه تک سلولی متشکل از سلول‌های فلسی با میزان کمی کراتین می باشد که برجستگی‌های ریزی (microridge) در سطح بیرونی آن توسعه می یابد. این برجستگی‌های ریز حاوی موکوس و مواد ضد میکروبی است که عمدتاً توسط سلول‌های جامی شکل و سلول‌های گریز شکل واقع در لایه میانی اپیدرم به سطح ترشح می شوند. هر چند سلول‌های گریز شکل تنها در اپیدرم ماهیان استرئوفیزی و راسته مارماهیان وجود دارند. آنالیز بافت‌شناسی ساختار اپیدرم پوست قزل‌آلای رنگین کمان نیز نشان داد که در این ماهی تنها سلول‌های جامی شکل مسئول ترشح موکوس بوده و درحد فاصل سلول‌های اپیتیلیال بخش میانی تا سطحی اپیدرم پراکنش دارند (شکل ۴). لایه میانی اپیدرم متشکل از انواع مختلف سلول شامل غدد تک سلولی (از جمله سلول‌های موکوسی و سلول‌های گریز شکل)، سلول‌های حسی، سلول‌های یونی، سلول‌های ایمنی، سلول‌های رنگدانه‌ای و سلول‌های تمایز نیافته می باشد. بخش قاعده‌ای اپیدرم شامل یک لایه تک سلولی (لایه پایه) است که از طریق همی‌دسموزوم به غشای پایه متصل می شود. لایه قاعده‌ای اپیدرم را به درم متصل می کند (Chang and Hwang, 2011; Esteban, 2012; Salinas et al., 2011).

ساختار و ضخامت اپیدرم پوست براساس گونه ماهی، سن و فاکتورهای محیطی متفاوت می باشد به عنوان مثال، فراوانی سلول‌های جامی شکل ممکن است براساس فصل و همچنین در خلال فرایندهای دگردیسی، بلوغ جنسی یا سازگاری با آب دریا تغییر کند (Campinho, 1981; Kim et al., 2008; Wendelaar and Meis, 2007). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تراکم سلول‌های جامی شکل و ضخامت اپیدرم پوست قزل‌آلای رنگین کمان با افزایش دما از فصل زمستان تا پاییز افزایش یافت. مطالعات قبلی نویسندگان نشان داد که بار میکروبی آب با افزایش دما از زمستان تا پاییز افزایش یافت (در دست انتشار). مواجهه حاد با فاکتورهای محرک سیستم ایمنی ممکن است باعث ترشح سلول‌های جامی شکل به صورت هولوکربین و در نتیجه کاهش تعداد آن‌ها شود، درحالی که مواجهه مزمن با یک ماده محرک ممکن است باعث افزایش فراوانی این سلول‌ها شود که با سرعت بیش‌تری از سلول‌های پوششی لایه‌های پایین‌تر اپیدرم تمایز حاصل می کنند و با تولید موکوس بیش‌تر، موجب افزایش مکانیسم دفاعی می شوند (Whitear 1986). مارل و همکاران (Marel et al., 2010) نشان دادند که تراکم سلول‌های جامی شکل اپیدرم پوست کپور معمولی در معرض آب با بار میکروبی بالا افزایش یافت، اما برخلاف مطالعه ما ضخامت اپیدرم به طور معنی داری کاهش یافت. عوامل فیزیولوژیکی از جمله تحرک ماهی، تغذیه و بلوغ جنسی نیز می توانند در تغییر فصلی ساختار و ضخامت اپیدرم مؤثر باشند. به عنوان مثال بورتون و فلچر (Burton and Fletcher, 1983) در تحقیقی با عنوان تغییرات فصلی در اپیدرم جمعیت ساحلی فلاندر زمستانی در منطقه والبوم (Walbaum) نشان دادند که فراوانی سلول‌های جامی شکل در زمستان که فعالیت

کلی ماهی پایین است، کاهش می یابد. درحالی که در اواخر زمستان فراوانی این سلول‌ها به سرعت افزایش یافت که احتمالاً در ارتباط با از سرگیری تغذیه و فعالیت شدید بود. آن‌ها همچنین گزارش کردند که لایه اپیدرم در تابستان نازک‌تر از زمستان بود. این مشاهدات احتمالاً در ارتباط با هورمون‌های مؤثر بر ساختار اپیدرم ماهیان استخوانی می باشد. بولاک و همکاران (Bullock et al., 1976) نتایج متفاوتی را گزارش کردند. آنها هیچ شواهدی از تغییر فصلی اپیدرم نمونه‌های بالغ *Merlangius merlang* مشاهده نکردند.

نتایج آنالیز بافت‌شناسی اپیدرم قزل‌آلای رنگین کمان همچنین نشان داد که اندازه سلول‌های جامی شکل در بچه‌ماهی‌ها (W_1) تحت تأثیر فصل نمی باشد، درحالی که در ماهیان بزرگتر W_2 و W_3 اندازه سلول‌های جامی شکل با افزایش دما در فصل پاییز کاهش یافت. این احتمالاً در ارتباط با افزایش در تراکم این سلول‌ها در فصل پاییز می باشد. گریگ و همکاران (Grag et al., 2010) دریافتند که تراکم سلول‌های موکوسی در گربه‌ماهی *Ancistrus dolichopterus* پایین اما اندازه آنها بسیار بزرگ می باشد.

با افزایش اندازه ماهی، تراکم سلول‌های جامی شکل افزایش یافت. اما اندازه این سلول‌ها تحت تأثیر اندازه ماهی قرار نگرفت به جز در فصل بهار که بزرگترین سلول‌های جامی شکل مربوط به ماهی‌های بزرگتر W_3 بود. نتایج فاست و همکاران (Fast et al., 2002) در مطالعه ساختار اپیدرم قزل‌آلای رنگین کمان برخلاف نتایج حاضر بود. آنها گزارش کردند که ضخامت اپیدرم و تراکم سلول‌های موکوسی در قزل‌آلای رنگین کمان آب شور مشابه قزل‌آلای آب شیرین با اندازه‌های مختلف بود. این پیشنهاد می کند که هیچ ارتباطی بین اندازه ماهی و ضخامت اپیدرم و تراکم سلول‌های موکوسی در این گونه وجود ندارد.

اندازه‌گیری تعداد و اندازه سلول‌های جامی شکل به عنوان معیار اندازه‌گیری تولید موکوس محسوب می شود. آنالیز بیوشیمیایی موکوس پوست قزل‌آلای رنگین کمان نشان داد که همزمان با افزایش تراکم سلول‌های جامی شکل در فصل بهار غلظت پروتئین محلول موکوس نیز در هر سه گروه وزنی مورد مطالعه افزایش یافت. در گروه وزنی W_2 ، علی‌رغم ثابت بودن تراکم سلول‌های جامی شکل و افزایش اندازه آنها در فصل پاییز، میزان پروتئین محلول کاهش یافت، درحالی که انتظار می رفت میزان آن افزایش یابد.

ترکیب پروتئین موکوس پوست می تواند تحت تأثیر فاکتورهای اندوژن (به عنوان مثال، جنس و مراحل تکاملی) و فاکتورهای اگزوژن (به عنوان مثال تغییرات محیطی از جمله، شوری، pH، و آلودگی‌های میکروبی) قرار گیرد. به عنوان مثال، ذاکر و همکاران (Zaker et al., 2012) در بررسی ترکیب موکوس پوست ماهی سفید مهاجر نشان دادند که تعداد باندهای پروتئین در انتقال از محیط دریا به رودخانه افزایش یافت. پروفیل پروتئین موکوس قزل‌آلای رنگین کمان نیز اختلاف فصلی در هر سه گروه وزنی نشان داد. در پاییز، پروتئین‌های با وزن مولکولی کمتر از ۳۵ کیلو دالتون غالب بودند، درحالی که در زمستان این پروتئین‌ها مشاهده نشدند. این یافته‌ها می توانند در ارتباط

- intestine of naturally infected *Salmo trutta*. Diseases of Aquatic Organisms, 51: 27-35.
- Ellis A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative Immunology, 25: 827-839.
- Esteban M.A. 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. International Scholarly Research Notices Immunology, 20(10): 1-29.
- Fagana M.S., Byrne-Ring N.O., Ryan R., Cotter D., Whelan K., Mac Evilly U. 2003. A biochemical study of mucus lysozyme, proteins and plasma thyroxine of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during smoltification. Aquaculture, 222: 287-300.
- Fast M.D., Sims D.E., Burka J.F., Mustafa A. Ross N.W. 2002. Skin morphology and humoral non specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comparative Biochemistry Physiology. A, 132: 645-657.
- Fernandes J.M.O., Molle G., Kemp G.D., Smith V.J. 2004. Isolation and characterisation of oncorhynchin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Developmental and Comparative Immunology, 28: 127-138.
- Garg T.K., Domingos F. X. V., Almeida-Val V. M. F., Val A.L. 2010. Histochemistry and functional organization of the dorsal skin of *Ancistrus dolichopterus* (Siluriformes: Loricariidae) Neotropical Ichthyology, 8(4):877-884.
- Kim C.H., Park M.K., Kang E. J. 2008. Minute tubercles on the skin surface of larvae in the Korean endemic bitterling, *Rhodeus Pseudosericeus*. J. Appl. Ichthyol, 24: 269-275.
- Laemmli U.K. 1997. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Le Morvan C., Troutand D., Deschaux P. 1998. Differential effects of temperature on specific and non-specific immune defences in fish. J. Exp. Biol. 201: 165-168.
- Lebedeva N.Y. 1999. Skin and superficial mucus of fish: biochemical structure and functional role. In: Saksena D.N. (Ed.). Ichthyology: Recent Research Advances. Science publishers, New Hampshire. pp. 179-193.
- Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem, 193: 265- 275.
- Magnadottir B. 2010. Immunological control of fish diseases. Marine Biotechnology, 12: 361-379.
- Magnadottir B., Jonsdottir H., Helgason S., Bjornsson B., Solem S.T., Pilstrom, L. 2001. Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L.). Fish and Shellfish Immunology, 11: 75- 89.
- Marel, M.V., Caspari N., Neuhaus H., Meyer W., Enss M.L., Steinhagen D. 2010. Changes in skin mucus of common carp, *Cyprinus carpio* L., after exposure to water with a high bacterial load. Journal of Fish Diseases, 33: 431-439
- Moore J.D., Ototake M., Nakanishi T. 1998. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. Fish and Shellfish Immunology, 8:

با افزایش دما و در نتیجه بار میکروبی آب در فصل پاییز در مقایسه با فصول دیگر باشد. پپتیدهای ضد میکروبی با وزن مولکولی کمتر از ۳۰-۲۵ کیلو دالتون دارای ویژگی‌های کاتیونی و هیدروفیک هستند که به نظر می‌رسد برای فعالیت ضد میکروبی آن‌ها ضروری می‌باشد. همچنین یک باند با وزن مولکولی ۷ کیلو دالتون فقط در فصل پاییز مشاهده شد. این باند به نظر می‌رسد مرتبط با پروتئین آنکورهینچین II باشد که یک پپتید ضد میکروبی با وزن تقریبی ۷۱۹۳ دالتون است که قبلاً از عصاره اسیدی موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان جدا شده است. این پپتید حتی در غلظت‌های بسیار کم دارای خاصیت ضد میکروبی در مقابل هر دو باکتری‌های گرم منفی و مثبت می‌باشد (Fernandes et al., 2005).

۵ | تشکر و قدردانی

از ریاست محترم دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه علوم پزشکی گرگان جهت پشتیبانی و تأمین امکانات آزمایشگاهی و از همکاری‌های ارزنده سرکار خانم مهندس شمیرا ملک‌محمودی کارشناس بخش بیوشیمی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی گرگان سپاسگزاری می‌شود.

پست الکترونیک نویسندگان

مرضیه ابوالفتحی: m.aboolfath@yahoo.com
آرش اکبرزاده: akbarzadeh@ut.ac.ir
عبدالمجید حاجی‌مرادلو: ahajimoradloo@yahoo.com
حمیدرضا جوشقانی: joshaghani@goums.ac.ir

REFERENCES

- Bly J., Clem L. 1992. Temperature and teleost immune functions. Fish and Shellfish Immunology, 2: 159-171.
- Buchmann K., Bresciani J., Jappe C. 2004. Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. Journal of Fish Diseases, 27:99-104.
- Bullock A.M., Roberts R.J., Gordon J.D.M. 1976. A study on the structure of the whiting Integument, *Merlangius merlangus*L. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 56: 213-226.
- Burton, D., Fletcher, G.L. 1983. Seasonal changes in the epidermis of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom, 63(2): 273-287.
- Campinho M.A. 2007. Molecular and histological changes in skin from larval to an adult phenotype during bony fish metamorphosis. Cell and Tissue Research, 327: 267-284.
- Chang W.J., Hwang P.P. 2011. Development of zebrafish epidermis. Birth Defects Res. C Embryo Today, 93: 205-214.
- De Veer M.J., Kemp J.M., Meeusen E.N.T. 2007. The innate host defence against nematode parasites. Parasite Immunology, 29: 1-9.
- Dezfuli B.S., Pironi F., Giari L., Domeneghini C., Bosi G. 2002. Effect of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on putative neuromodulators in the

نحوه استناد به این مقاله:

ابولفتحی م.، اکبرزاده آ.، حاجی مرادلو ع.، جوشقانی ح.ر. تغییرات فصلی در پروفیل پروتئین موکوس و ساختار اپیدرم پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* در طی مراحل مختلف پرورش. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۴۰۰، ۲۶-۱۷: ۹(۲).

Abolfathi M., Akbarzadeh A., Hajimoradloo A., Joshaghani H.R. Seasonal variation in the epidermis structure and protein profile of the skin mucus of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of farming. Journal of Applied Ichthyological Research, University of Gonbad Kavous. 2021, 9(2): 17-26.

- 8: 393–407.
- Nigam A.K., Kumari U., Mittal S., Mittal A.K. 2012. Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 1245-1256.
- Ross N.W., Firth K.J., Wang A., Burka J.F., 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.*, 41:43–51.
- Salinas I., Zhang Y., Sunyer J.O. 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of 520 teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35: 1346–1365.
- Stolen J.S., Draxler S., Nagle J.J. 1984. A comparison of temperature- mediated immunomodulation between two species of flounder. *Immunol. Commun.* 13: 245–253.
- Subramanian S., Ross N.W., MacKinnon S.L. 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comp Biochem Physiol Part B.* 150: 85-92.
- Tsutsui S., Okamoto M., Tasumi S., Suetake H., Kikuchi K., Suzuki Y. 2006. Novel mannose-specific lectins found in torafugu, *Takifugu rubripes*: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 1: 122 – 127.
- Vadstein O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155: 401-417.
- Wendelaar B.S.E., Meis S. 1981. Effect of external osmolality, calcium and differentiation of the epidermal cells of the cichlid teleost *Sarotherodon mossambicus*. *Cell Tissue Res*, 221: 109–123.
- Whitcar M. 1986. The skin of fishes including cyclostomes epidermis and dermis. In: BereiterHahn, J., Maltoltsy A.G., Richards K.S. (Eds). *Biology of the Integument. Vertebrates*, Berlin, Vol. 2, pp: 8-64.
- Wilkins N.P., Jancsar S. 1979. Temporal variations in the skin of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology*, 15: 299-307.
- Zaker F., Imanpour Namin J., Sattari M., Hadavi M. 2012. Bloods Serum lysozyme activity and white fish skin of the Caspian Sea (*Rutilus Frisii* in saltwater and freshwater ecosystem). *Journal of Aquatic Development*, 10(1): 53-61.

Seasonal variation in the epidermis structure and protein profile of the skin mucus of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of farming

Abolfathe M¹., Akbarzadeh A^{*2}., Hajimoradloo A³., Joshaghani H.R⁴.

¹ PhD Student, Aquatics Proliferation and breeding, Faculty of Marine Science and technology, University of Hormozgan, Hormozgan, Iran

² Associate Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

³ Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

⁴ Associate Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Type:

Original Research Paper

Paper History:

Received: 16-01-2018

Accepted: 29-01- 2018

Corresponding author:

Akbarzadeh A. Associate Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Email: akbarzadeh@ut.ac.ir

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of fish size and seasonality on the epidermis structure and protein profile of the skin mucus of Rainbow trout. Skin mucus samples were collected over three consecutive seasons including late winter, mid spring and early autumn. In each season, sampling (n=10) was performed separately from three different weight groups including 2-20 gr fish (W₁), 100-200 gr fish (W₂) and 400-600 gr fish (W₃). The results of histological analysis showed that goblet cell density and epidermal thickness increased with increasing temperature from winter to autumn in all weight groups ($p < 0.05$). In juvenile (W₁ fish), the size of goblet cells was not affected by the season ($p > 0.05$), while in larger fishes (W₂ and W₃), the size decreased with increasing temperature in the autumn ($p < 0.05$). There was a positive and significant relationship between fish size and density of goblet cells. Biochemical analysis of skin mucus showed that protein concentration increased simultaneously with an increase in goblet cell density ($p < 0.05$). The protein profiles of rainbow trout mucus showed seasonal variations in all three weight groups ($p < 0.05$). In autumn, the small proteins with molecular weights less than 35 kDa were more prominent, while these proteins were not observed in the winter. Mucus protein profile was approximately same among different weight groups.

Keywords: goblet cell, epidermal thickness, soluble protein, SDS-PAGE