



مقاله مروری:

مروری بر سیستم ایمنی و مقاومت در برابر استرس شاه میگوی آب شیرین

مسعود صیدگر^{*}، علی نکوئی فرد^۱، رضا جلیلی^۱

*seidgar21007@yahoo.com

۱- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۳

چکیده

شاه میگو از جمله آبزیان بسیار پر ارزش و اقتصادی شیلاتی استان غربی، ایران است. ولی متأسفانه با کاهش ذخایر از سال ۱۳۹۴ و اجرای طرح ممنوعیت صید از سال ۱۳۹۷ همچنان عائدی آن از سد مخزنی ارس صفر است. در همین زمینه، تکثیر و پرورش مصنوعی شاه میگو با هدف بازسازی ذخایر و توسعه گونه‌های بومی از ذخایر ژنتیکی بومی کشور اهمیت دارد. بنابراین، شناخت هرچه بیشتر فیزیولوژی شاه میگو به‌ویژه شناخت کارکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر استرس و بیماری ضروری می‌نماید. ایمنی شاه میگوی آب شیرین به دلیل نیاز فوری برای حفاظت از آن مورد توجه زیادی قرار گرفته است. امروزه درک سیستم‌های دفاعی سلولی و همورال شاه میگوی آب شیرین افزایش یافته است، اگرچه ساز و کارهای نظارتی درگیر در این فرآیندها باید به‌روز رسانی شوند. مطالعه حاضر شامل مروری بر ایمنی شاه میگوی آب شیرین شامل یک سیستم طبقه‌بندی از زیرانواع هموسیت، عوامل مولکولی دخیل در خون‌سازی و نقش جمعیت‌های هموسیت در پاسخ‌های سلولی، از جمله نفوذ هموسیت، التهاب، کپسول‌گذاری و پیوند با مسیر مرگ سلولی تله خارج سلولی (ETosis)، همچنین هویت و عملکرد سلول‌های هیالین، تولید نئوپلازی و موضوع در حال ظهور نقش هموسیت‌های بی‌پایه در ایمنی محیطی است. شرایط استرس مراقبت مادری را افزایش می‌دهد و رشد و نمو شاه میگوهای نوجوان را به تأخیر می‌اندازد. سروتونین اما نه دوپامین، پاسخ استرس و رفتار اضطرابی را در شاه میگوی آب شیرین کنترل می‌کند. برای تولید یک نژاد شاه میگو با فنوتیپ مطلوب مقاومت در برابر بیماری و رشد سریع، می‌توان از طریق به‌گزینی فنوتیپی والدین با هدف اصلاح صفات مقاومت در برابر بیماری و تلاقی برای تولید نسل مقاوم در برابر استرس و بیماری برای کاهش مرگ‌ومیر، افزایش تولید، افزایش زمان و مسافت حمل‌ونقل استفاده نمود.

کلمات کلیدی: شاه میگوی آب شیرین، هموسیت‌ها، سلول‌های هیالینی، خون‌سازی، استرس

مقدمه

ارزش بالای تجاری شاه میگوهای دراز آب شیرین در اروپا، باعث شده است که به عنوان یک تولید مهم اقتصادی مطرح باشد. به همین دلیل علاقه زیادی برای پرورش گونه‌های شاه میگو حتی در کشورهایی که مصرف کم یا حتی فاقد بازار مصرف آن هستند، وجود دارد. کاهش زیاد در تعداد شاه میگوی آب شیرین بومی اروپا ناشی از تکرار شیوع بیماری، چنین موجوداتی را (*Astacus astacus*) به انقراض نزدیک کرده است (Jussila et al., 2011; Makkonen et al., 2014). دانشمندان نگرانی‌های خود را در مورد ذخایر طبیعی گونه‌های در معرض خطر شاه میگوی آب شیرین و تحقیقات برای کشف علل اهداف حفاظتی افزایش داده‌اند. گزارش شده است که بیماری طاعون شاه میگوی آب شیرین، به عنوان تهدید اصلی برای این گونه با جابه‌جایی تصادفی یا تجاری گونه‌های مهاجم مانند گونه‌های آمریکایی شمالی (*Procambarus* و *Pacifastacus leniusculus*) و *clarkii*، ناقل اوومیسیت عامل بیماری *Aphanomyces astaci* مرتبط است (Persson et al., 1987; Edgerton et al., 2004). مشخص‌ترین علائم بیماری، لکه‌های ملانین در کوتیکول افراد آلوده یا مرده است.

مطالعات گسترده نشان داده است که چنین لکه‌های ملانین (ملانیزاسیون) نتیجه پاسخ سیستم ایمنی بدن با هدف محصور کردن عامل بیماری‌زا در غلاف ملانین است تا از تهاجم و رشد آن به داخل هموکول جلوگیری کند (Nyhlén and Unestam, 1980; Svoboda et al., 2017). *A. astasi* قادر است شاه میگوی آب شیرین گونه‌های بومی و مهاجم را به همان اندازه آلوده کند، با این حال، گونه‌های مهاجم (*P. leniusculus*, C. ¹*quadracarinated*, and *Procambarus clarkii*) کمتر آسیب‌پذیر هستند (Oidtmann et al., 2002; Cerenius et al., 2008; Jussila et al., 2011). گونه‌های بومی اروپایی آسیب‌پذیر (*A. astacus*)، عمدتاً لکه‌های ملانیزه بسیار کمی تشکیل می‌دهند یا تقریباً فاقد لکه‌های ملانیزه هستند درحالی‌که ایجاد هیف‌ها مشخص است. پاسخ ایمنی افتراقی بین گونه‌های بومی و مهاجم از جمله سرنخ‌های اصلی است که باید در مطالعه و بررسی‌های مربوط به مصونیت شاه میگوی آب شیرین مورد توجه قرار گیرد (Smith and Ratcliffe, 1978; Persson et al., 1987; Persson et al., 1987). فعال سازی

¹ Red Swamp Crayfish

توصیف کلی ایمنی شاه میگوی آب شیرین

شاه میگوی آب شیرین، مانند همه بی‌مهرگان، فقط متکی بر ایمنی ذاتی است که شامل پاسخ‌های با واسطه همورال و سلولی می‌شود. فقدان پاسخ ایمنی اکتسابی (اختصاصی) در شاه میگوی آب شیرین به دلیل فقدان سلول‌های دودمان میلوئیدی است که قادر به تولید ایمونوگلوبولین‌ها^۴ (آنتی‌بادی‌های اختصاصی) علیه عوامل بیماری‌زای خاص در صورت عفونت‌های مکرر هستند (فقدان حافظه). بررسی اجزاء اصلی تشکیل‌دهنده پاسخ ایمنی در کنار عملکرد مشارکتی پاسخ‌های با واسطه سلولی و همورال و عوامل مربوط به آنها در شاه میگوی آب شیرین (Bouallegui, 2021)، مشخص کرد که این فقدان پاسخ ایمنی اکتسابی با غناء راهکارهای مختلف با واسطه سلولی و چندین نوع عامل همورال که هر دو دفاع ذاتی شاه میگوی آب شیرین یعنی گیرنده‌های تشخیص عوامل بیماری‌زای چندگانه (PRRs^۵) را تشکیل می‌دهند، متعادل می‌شود (Ratcliffe et al., 1985; Cerenius and Söderhäll, 2018). این دفاع‌ها در یک راه همکاری برای آغاز اقدامات دفاعی موثر فعال می‌شوند و آنها را

² Prophenoloxidase

³ Total Hemocyte Count

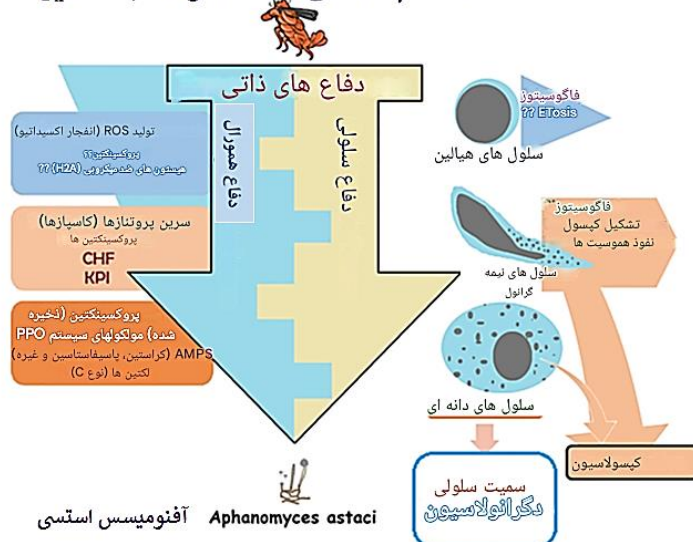
⁴ Immunoglobulins

⁵ Pattern Recognition Receptors

پاسخ با واسطه سلولی که نیاز به فعالیت مستقیم خود سلول (فاگوسیتوز دارد) که شروع کننده مکانیسم های مسیر مرگ سلولی (سمیت سلولی، کپسول گذاری) است (شکل ۱).

می توان بر اساس دو پاسخ اصلی طبقه بندی نمود: یک پاسخ با واسطه همورال شامل عوامل همورال تولید و منتشره به وسیله سلول های ایمنی (پپتیدهای ضد میکروبی، آنزیم های هیدرولیتیک و مولکول های سیستم پروفنول اکسیداز و ...) و یک

سیستم ایمنی شاه میگوی آب شیرین



شکل ۱: ارائه شماتیک پاسخ ایمنی شاه میگوی آب شیرین

ارتشاح هموسیت ممکن است منجر به تغییرات ساختاری در بافت شناسی بافت هدف در نزدیکی ریزمحیط اطراف عفونت شود. پاسخ التهابی و ارزیابی آسیب شناسی بافتی مرتبط با نفوذ هموسیت به یک شاخص کمی منفرد با استفاده از صفات آسیب شناسی بافتی متعدد برای امکان تمایز دقیق تر وضعیت سلامتی ارگانسیم هایی مانند دوکفه ای ها و ماهی ها با هدف توسعه یک سیستم دقیق برای ارزیابی وضعیت سلامت حیوانات پرورشی منتهی می شود (Bernet et al., 1999, Bouallegui et al., 2018). با این حال، مطالعات بسیار کمی در مورد آسیب شناسی بافتی شاه میگوی آب شیرین انجام شده است. جالب توجه است، مطالعات با استفاده از شاخص های هموسیتی به عنوان ابزاری برای ارزیابی تعدیل پاسخ سیستم ایمنی در سخت پوستان (عمدتاً THC و DHC توصیف کننده کاهش تعداد هموسیت های در گردش به دلیل به کارگیری و ارسال آنها به بافت های آلوده، برای جلوگیری از انتشار عوامل بیماری زا به هموسل)، می تواند با ارزیابی آسیب شناسی بافتی کمی برای داده های شاخص هموسیت دقیق تر و تکمیل نتیجه گیری در ارتباط باشد (Bouallegui, 2021).

پاسخ ایمنی با واسطه سلولی

پاسخ های سلولی نیازمند عمل مستقیم خود سلول برای خنثی کردن مهاجمان بیگانه از طریق سازوکارهایی مانند فاگوسیتوز، مسیرهای مرگ سلولی (آپوپتوز و اتوفازی) و پاسخ التهابی (تشکیل ندول و کپسول گذاری) هستند. این راهکارها یک پیش نیاز مشترک دارند که شامل ارتشاح هموسیت (هموسیتوز) یا مهاجرت بیش از حد هموسیت ها از گردش خون به محل عفونت است. تغییرات در شکل یا ویژگی های هموسیت ها علاوه بر بررسی تعداد کل هموسیت (THC)، شمارش افتراقی هموسیت (DHC^1) و ارزیابی فعالیت های دفاعی مانند فاگوسیتوز، زنده ماندن سلولی، سمیت سلولی و تغییرات فیزیولوژیک مختلف، سنجشی مفید برای بررسی نوسان پاسخ ایمنی شاه میگوی آب شیرین در نظر گرفته شده است. هموسیتوز به فراخوانی گسترده و نفوذ هموسیت ها به بافت هایی که عفونت/استرس در آنها شناسایی شده است، نیاز دارد.

¹ Differential Hemocyte Count

شایان ذکر است که فعال شدن تولید ملانین به وسیله سیستم پروفنول اکسیداز در دفاع سخت پوستان به دلیل کمبود تعداد مناسب هموسیت مورد نیاز برای ایفاء این نقش، ممکن است مختل شود. این یافته در *Astacus astacus* (شاه میگوی اروپایی) آلوده به ¹*Aphanomyces astaci* برجسته شده است و به فقدان ملانیزاسیون در بافت های عفونی که رشد هیف دارند مربوط می باشد که در مورد گونه های مهاجم (*Pacifastacus leniusculus*²) گونه ای که در برابر *A. astaci* مقاومت نشان می دهد، صدق نمی کند (Persson et al., 1987; Cerenius et al., 2003; Wu et al., 2008). در این زمینه، به تصویر کشیدن ویژگی های هموسیت ها (و تفاوت زیر جمعیت های آنها)، عنصر کلیدی پاسخ ایمنی شاه میگوی آب شیرین، قابل توجه است.

طبقه بندی جمعیت های فرعی هموسیت ها

خصوصیات مورفولوژیک / طبقه بندی

هموسیت ها، عامل کلیدی ایمنی شاه میگوی آب شیرین، علاوه بر تولید اکثر عوامل همورال به وسیله آنها، تقریباً در هر فعالیت دفاعی از طریق اقدام مستقیم (فاگوسیتوز، تشکیل کپسول) شرکت می کنند (Cerenius and Söderhäll, 2018). هموسیت ها از اوایل دهه ۱۸۸۰ توصیف شده اند. جمعیت های هموسیت به طور کلی با توجه به خصوصیات مورفولوژیک اندازه سلول و پیچیدگی ساختاری سیتوپلاسم آنها (نسبت هسته به سیتوپلاسم و وجود یا فقدان دانه) طبقه بندی شده اند (Bouallegui, 2021). چنین مشخصات عمدتاً با طبقه بندی عملکردی یا شیمیایی سلولی هر زیر جمعیت (وابسته به عمل دفاعی اصلی و یا فعالیت آنزیمی از طریق دانه های محصور آنها، مانند پراکسیداز) تثبیت می شدند (Lanz et al., 1993; Matozzo and Mrin, 2010).

نکته با اهمیت این که، با وجود پیشرفت قابل توجه در تحقیقات به عمل آمده توسط محققین، تعداد نهایی جمعیت های هموسیتی شاه میگوی آب شیرین هنوز به طور کامل مشخص نشده است. با این حال، قدیمی ترین و پذیرفته شده ترین سیستم خوشه بندی، سه نوع زیر جمعیت هموسیت را ارائه می دهد: سلول های

هیالین (³HC) یا همان هیالینوسیت ها، سلول ها یا هموسیت های نیمه دانه دار (⁴SGC) و سلول ها یا هموسیت های دانه دار (⁵GC) که گرانولوسیت نیز نامیده می شوند. مشخصات کلی در جدول خلاصه شده است. سلول های هیالین به عنوان کوچکترین نوع سلول توصیف می شوند در حالی که هموسیت های نیمه دانه دار به طور معمول دارای یک شکل دراز است. به علاوه، سلول های دانه دار به عنوان بزرگترین نوع سلول توصیف می شود (Bouallegui, 2021).

خصوصیات عملکردی

در مورد فعالیت های عملکردی هر زیر گروه هموسیتی هنوز هم در مجامع علمی برخی اختلافاتی وجود دارد (Persson et al., 2003; Cerenius et al., 1987) ولی طبقه بندی مشخصی در اوایل دهه ۸۰ میلادی ارائه گردید. با این حال، تکنیک های جداسازی Smith و Söderhäll (۱۹۸۳) در مورد هموسیت ها در آن زمان شرح مفصلی از فعالیت های عملکردی را ارائه کرد (Smith and Söderhäll, 1983). در این زمینه، سلول های هیالین به عنوان سلول های فاگوسیت کننده توصیف شدند، سلول های نیمه دانه دار نوع اصلی تضمین کننده کپسول گذاری و سلول های دانه دار عمدتاً در ذخیره یا آزادسازی مولکول های فعال مانند مولکول های سیستم پروفنول اکسیداز در داخل یا از دانه های نمو یافته خود عملکرد اختصاصی داشتند. با این حال، تمام زیر نوع های گزارش شده، در پاسخ ایمنی با بازدهی متفاوت نسبت به فرآیندهای مکانیکی نقش به سزایی ایفاء می کنند. برای مثال، برای بیشتر گونه های شاه میگوی آب شیرین که مورد مطالعه قرار گرفته است (*Astacus astacus*, *Pacifastacus leniusculus*⁶, *Cherax quadricarinatus* و *Procambarus clarkii*)، سلول های نیمه دانه دار به عنوان مهم ترین خانواده در واکنش ایمنی شامل تشکیل کپسول، کپسول گذاری و تضمین فعالیت فاگوسیتی متوسط علاوه بر ملانیزاسیون از طریق فعال سازی واکنش های آبشاری سیستم پروفنول اکسیداز توصیف می شوند. فعال سازی سیستم پروفنول اکسیداز نقش اصلی سلول های دانه دار است که هیچ گونه فعالیت فاگوسیتی ندارد.

¹ قارچ عامل طاعون شاه میگوی آب شیرین

² Signal Crayfish

³ Hyaline Cells

⁴ Semi Granular Cells or Hemocytes

⁵ Granular Cells or Hemocytes

⁶ Australian Freshwater Crayfish.

جدول ۱: خلاصه‌ای از ویژگی‌های سه زیر جمعیت هموسیت در شاه میگوی آب شیرین (Bouallegui, 2021)

زیر جمعیت هموسیتی	اندازه (میانگین) میکرومتر	خصوصیات (پیچیدگی ساختاری سیتوپلاسم)
سلول های هیالینی (HC)	۱۰	سلول های بیضی شکل -نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم -هسته مرکزی یوکرومیک -دانه های بسیار کم
سلول های نیمه دانه دار (SGC)	۱۵	-نسبت پایین هسته به سیتوپلاسم -نسبت پایین هسته به سیتوپلاسم -سلول های کشیده -هسته بزرگ مرکزی -اندامک های بخوبی نمو یافته (شبکه آندوپلاسمی خشن) -دانه های متعدد
سلول های دانه دار (GC)	۲۱	-نسبت بسیار پایین هسته به سیتوپلاسم -سلول های دوکی شکل -هسته محصور، نوکلئوپلاسم به خوبی پراکنده شده -ساختارهای دانه دار لیمویی بزرگ، به خوبی نمو یافته

فعالیت فاگوسیتی به طور عمده به سلول های هیالین اختصاص داده شده است (شکل ۱). متأسفانه، بسیاری از تحقیقات (در شرایط آزمایشگاهی و در داخل بدن) داده های بحث برانگیز مربوط به فعالیت عملکردی سلول های هیالین گزارش کرده اند و این به دلیل حضور بسیار کم آنها در گردش خون است. حضور کمیاب / عملکرد فرضی سلول های هیالین و اهمیت آنها با نمونه دودمان انواع مختلف سلول های ایمنی تشدید شده که شامل تکثیر سلول های ایمنی است که فقط در بافت خونساز رخ می دهد. بنابراین، تنها سلول های بسیار خوب تمایز یافته و بالغ به گردش خون آزاد می شوند. سلول های نیمه دانه دار و دانه دار بالغ تا زمانی که در گردش خون قرار نگیرند، نمی توانند به طور کامل فعال شوند. متأسفانه هموسیت ها، سلول هایی با ویژگی های تمایز نیافته نابالغ هستند (که دارای فنوتیپ تکثیرشونده، بیان کننده (PCNA¹) بوده و معمولاً پروهموسیت نامیده می شوند). مشخص شده است که سلول های هیالین، تحت شرایط خاص، عمدتاً پس از یک چالش ایمنی آزاد می شود. بنابراین، به وجود و عملکرد چنین انواع سلولی (به تفصیل در بخش های بعدی)، پرداخته خواهد شد (Bouallegui, 2021).

نشانگرهای مولکولی ریز جمعیت های مختلف هموسیت
علاوه بر این، بسیاری از مطالعات رونویسی و پروتئومی به طبقه بندی انواع سلول های هموسیتی، به دنبال نشانگرهای مولکولی خاص بیان شده به وسیله هر نوع کمک کرده و خصوصیات عملکردی آنها را بهبود بخشیده است (Cerenius et al., 2003; Wu et al., 2008; Söderhäll and Junkunlo, 2019). گزارش شده است که عامل رونویسی PIRunt در سلول های نابالغ بیان نشده است در حالی که به طور هم زمان با سیستم پروفنول اکسیداز در هموسیت های نیمه دانه دار و دانه دار وجود دارد. توسعه سیستم پروفنول اکسیداز به سلول های دانه دار نشان داده شده است. علاوه بر این، مطالعات ایمونوهیستوشیمی وجود سوپراکسید دیسموتاز (SOD²) را در هموسیت های نیمه دانه دار و سلول های دانه دار گزارش کرد. با این حال، مطالعات بیان mRNA³ نشان داد که سلول های دانه دار، سوپراکسید دیسموتاز (به صورت مونومر) تولید می کند که به سطح بیرونی هموسیت های نیمه دانه دار (دایمریک) متصل می شود. گزارش شده که به طور اختصاصی تر، یک مهارکننده پروتئیناز از نوع

² Superoxide Dismutase³ Messenger Ribonucleic Acid¹ Presenting Proliferative Phenotype, Expressing Prohemocyte

گزارش شده است. اجزاء عامل رشد فیبروبلاست برای میانجی‌گری پاسخ‌های ایمنی موثر در برابر تخم‌های انگلی زنبوری مورد نیاز هستند. به عنوان دیدگاه، تجزیه و تحلیل scRNAseq نیازمند تجزیه و تحلیل بسیار ضروری است که باید برای رمزگشایی بیان نمایه‌های ژن برای درک سطح سیستم از تنوع هموسیت‌های شاه میگوی آب شیرین و عملکرد آنها انجام شود (Fu et al., 2020; Tattikota et al., 2020).

تولید زیر جمعیت‌های هموسیت

خون‌سازی

فرایندهای خون‌سازی از جمله فرایندهایی هستند که در مطالعات مربوط به ایمنی شاه میگوی آب شیرین، با هدف رمزگشایی مکانیسم‌های زمینه‌ای پاسخ ایمنی ناکافی در برابر بیماری‌هایی مانند بیماری طاعون شاه میگوی آب شیرین به خوبی توصیف شده‌اند. به طور کلی، تحقیقات انجام شده، منجر به یک نمای کلی تقریباً کامل مکانیسم‌های مولکولی که زیرخانواده‌های مختلف هموسیت را تولید می‌کنند، گردید. به طور خلاصه، بافت خونساز در *P. leniusculus* شامل چهار تا پنج دودمان سلولی است که در لوبول‌های احاطه شده به وسیله بافت همبند موضعی که در اطراف مغز شروع شده است و به دنبال آن در شریان چشمی به بافت هیپاتوپانکراس خلفی امتداد می‌یابد و با پوشاندن قسمت پشتی معده به پایان می‌رسد، مرتب شده‌اند. در شکل ۲، شمایی از محل‌های لوکالیزه شدن و بخش‌های متفاوت هیپاتوپانکراس و لوبول‌های خونساز که فازهای مختلف تولید هموسیت و چگونگی دستیابی انواع سلول‌های مختلف (نوع ۵-۱) به نشانگرهای مولکولی خاص خود نشان داده شده است. سلول‌های بافت خونساز در لوبول‌های ۱۰ خوشه سلولی برای هر لوبول خوشه‌بندی می‌شوند. مرفولوژی سلولی در چنین لوبول‌هایی شبیه به نواحی مختلف بافت خونساز خلفی، با فعالیت میتوزی کم در بافت مرکزی است که اطراف شریان چشمی را احاطه کرده است. در مقابل، فعالیت میتوزی بالایی در امتداد لبه‌های بافت خونساز و مرکز تکثیر قدامی (APC^7) شناسایی شده است. سلول‌های بافت خونساز به عنوان سلول‌های نوع ۱ الی نوع ۵ دسته‌بندی می‌شوند، با نوع ۱ دارای ویژگی‌های سلول‌های تمایز نیافته بدون یا با دانه‌های کمی (فعالیت میتوزی و بیان PCNA بالا، در قسمت راسی لوبول که در آن تکثیر

کازال (KPI^1) و عامل خونساز سخت پوستان (CHF^2) تنها به وسیله هموسیت‌های نیمه دانه‌دار بیان می‌شود. مطالعات اخیر نشان داد که هموسیت‌های شاه میگوی آب شیرین ($P. leniusculus$) بیانگر دو نوع ترانس گلوتامیناز است که معمولاً Pl_TGase1 و Pl_TGase2 نامگذاری می‌شوند و نشان دادند که چنین TGS³ مخصوص زیر جمعیت‌های مختلف هموسیت هستند. Pl_TGase1 فقط در هموسیت‌های نیمه دانه‌دار بیان می‌شود، اما به وسیله همه هموسیت‌های نیمه دانه‌دار بیان نمی‌شود و Pl_TGase2 فقط در سلول‌های دانه‌دار بیان می‌شود و دوباره به وسیله همه سلول‌های دانه‌دار بیان نمی‌شود (Junkunlo et al., 2020; Bouallegui, 2021).

شایان ذکر است که مزایای حاصل از فناوری‌های توالی‌یابی RNA⁴ تک سلولی پیشرفته (scRNAseq⁵) در سال‌های اخیر، بهبود قابل توجهی در گزارش زیر نوع هموسیت مگس سرکه ارائه می‌کنند که تا حد زیادی از تنها سه زیر نوع تجدید شده است: پلاسماتوسیت‌ها، سلول‌های کریستالی و لاملوسیت‌ها برای ایجاد یک پروفایل بیان ژن جامع برای هموسیت‌های در حال گردش مگس سرکه. در واقع، Fu و همکاران (۲۰۲۰) دو زیر گروه هموسیت جدید را در مگس سرکه شناسایی کردند: تاناسیت‌ها و پریموسیت‌ها با مجموعه‌های متفاوت ژن‌ها. با این حال، تاناسیت‌ها ژن‌های درگیر در پاسخ‌های مجزا به انواع مختلف باکتری را بیان می‌کند در حالی که پریموسیت‌ها سرنوشت سلولی و ژن‌های سیگنال‌دهی که به طور بالقوه در حفظ سلول‌های بنیادی در گردش خون درگیر هستند، را بیان می‌کنند. علاوه بر چهار زیرگروه‌های جدید پلاسماتوسیت‌های دیگر ($Ppn\beta$ ، $CAH7\beta$ ، $Lsp\beta$ و پلاسماتوسیت‌های مخزن)، هر کدام با نشانگرهای مولکولی منحصربه‌فرد و توابع پیش‌بینی شده متمایز. مطالعه بیشتر با هدف استفاده از scRNAseq در نقشه‌برداری هموسیت‌ها در شرایط التهابی مختلف در لارو انجام شد. متعاقباً، حالت‌های مبتنی بر بیان ژن‌های مختلف پلاسموسیت‌ها برطرف شده‌اند. علاوه بر این، زیر مجموعه‌ای نادر از سلول‌های کریستالی که عامل رشد فیبروبلاست را بیان می‌کنند (FGF^6) لیگاند بدون شاخه و لاملوسیت‌های بیان‌کننده گیرنده‌های بی‌جان (مشتاق)،

¹ Kazal-type Proteinase Inhibitor

² Crustacean Hematopoietic Factor

³ Transglutaminases

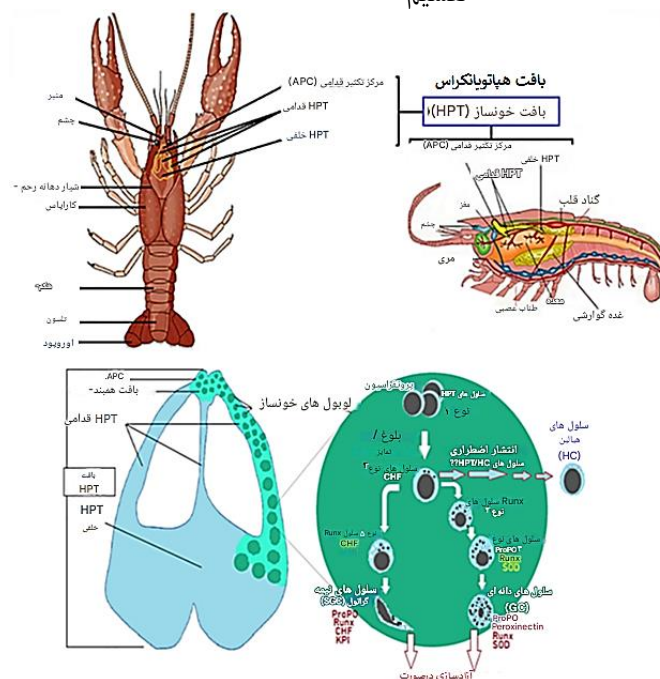
⁴ Ribonucleic Acid

⁵ Single-Cell RNA-Sequencing

⁶ Fibroblast Growth Factor

⁷ Anterior Proliferation Center

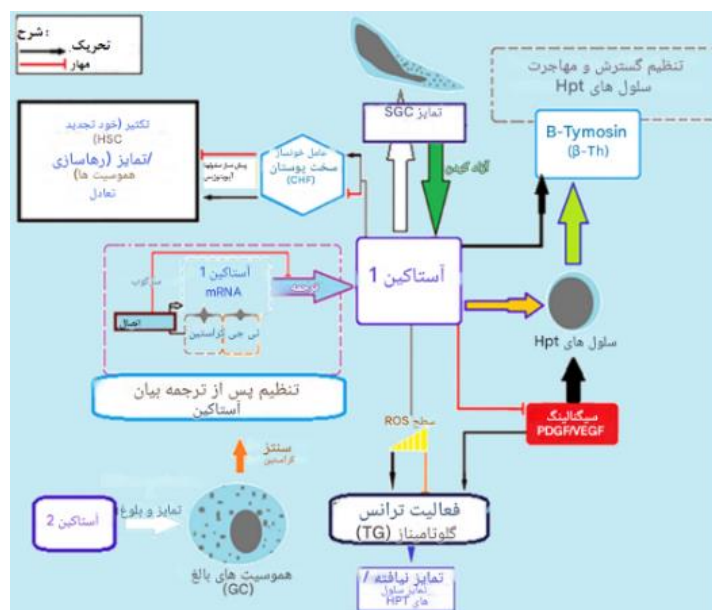
(تقسیم گسترده) سلول پیش ساز/بنیادی رخ می دهد، واقع است. هرچه به سمت مرکز لوبول پیش برویم، سلول ها مشخص تر و متمایز تر هستند. سلول های نوع ۵-۲ در موقعیت پستی بوده و با سلول های نوع ۲ مرتب شده اند، همگی دارای دانه هستند. نوع ۳ و ۴ بین لوبول ها یافت می شود که از همدیگر مجزا شده اند، فعالیت های



شکل ۲: نمودار یافت خونساز (هیاتو بانک اس) که مراحل مکانیکی خونسازی را نشان می‌دهد (Bouallegui, 2021).

خون‌سازی شامل چندین عامل مولکولی کلیدی مانند آستاکین‌ها (۱ و ۲)، پروتئین‌های سیتوکین مانند است که حاوی دامنه پروکینتیسین (PK^1) بوده و نقش عامل هورمون رشد برای تحریک تولید و آزادسازی هموسیت‌های جدید به گردش خون را ایفاء می‌کند. آستاکین‌ها از طریق کاهش عمل فعالیت ترانس گلوتامیناز عمل می‌کند. ترانس گلوتامینازها آنزیم‌های وابسته به پیوند دوگانه Ca^{2+} با سوبسترای کلاژن نوع 4 هستند که در انعقاد و کنترل خون‌سازی و سازماندهی ماتریکس خارج سلولی در شاه میگوی آب شیرین نقش دارد. هدف ترانس گلوتامیناز مهار تمایز و مهاجرت سلول‌های بنیادی است که به‌شدت به سیگنال‌دهی تنظیم و گسترش سلول‌های هپاتوپانکراس وابسته است. مشخص شده است که آستاکین ۱ برای تحریک تمایز همراه با هموسیت‌های نیمه دانه‌دار، عامل خون‌ساز سخت پوستان را القاء می‌کند تا آپوئوز سلول‌های بنیادی را مهار کرده

¹ Prokineticin



شکل ۳: تنظیم مکانیسم های خونساز شاه میگوی آب شیرین. عوامل مولکولی دخیل در تنظیم تولید هموسیت. هموسیت های نیمه دانه دار، سلول های نیمه دانه دار؛ G.C، سلول های دانه دار؛ TG، ترانس گلوتامیناز؛ ROS، گونه های فعال سازی مجدد اکسیژن؛ سلول های HPT، سلول های بافت خونساز. HSC، سلول های بنیادی خونساز (Bouallegui, 2021)

یکپارچه سازی اجزاء ایمنی شاه میگوی آب شیرین به مکانیسم های عملکردی

نقش جمعیت های هموسیتی در آرایش کپسول گذاری یک انگل بزرگ که به وسیله هموسیت ها نه فاگوسیتوز شده و نه بلعیده شده، باعث جذب هموسیت های جدید در محل عفونت شده تا مهاجم را با آنچه به عنوان کپسول گذاری شناخته می شود، جدا کنند. چنین فرآیندی معمولاً با فعال شدن سیستم پروفنول اکسیداز و تشکیل غلاف ملانین اطراف عامل بیماری زا که باید به وسیله کیتون های حاصل از واکنش های آبشاری هضم شود، همراه است. این فعالیت ها با هدف خنثی کردن عامل بیماری زا و جلوگیری از انتشار آن در هموسل انجام می شوند. به طور کلی، التهاب شامل چندین مرحله متوالی است که با مرحله شناسایی عوامل بیماری زا یا حس آسیب های بافتی شروع می شود.

به دنبال فراخوانی سلول های ایمنی به محل آلوده یا آسیب دیده جایی که مولکول های تاثیرگذار اضافی مانند پروتئین های لخته کننده (پروکسینکتین ها و ترانس گلوتامیناز)، به وسیله این سلول ها تولید و آزاد می شود تا عامل بیماری زا (تشکیل کپسول) جداسازی شود (شکل ۳). این فعالیت ها همچنین ممکن است

فراخوانی بیشتر هموسیت های تازه تشکیل شده از طریق ترشح پروتئین های سیتوکین مانند استاکین ۱ و ۲) که تکثیر سلول بنیادی و بلوغ هموسیت جدید را تحریک می کنند، شروع کنند. با این حال، با ارزیابی در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که تشکیل کپسول عمدتاً به وسیله سلول های نیمه دانه دار که برای تشکیل توده ها در اطراف گویچه های مختلف فراخوانی و مسطح می شوند، تضمین می شود (Persson et al., 1987; Bouallegui, 2021). چنین کپسول هایی بعدها به لایه های متراکم بسته بندی شده نمو می یابند که در مورد ساختارهای کمتر پایدار تشکیل دهنده سلول های دانه دار صدق نمی کند. سلول های هیالین به عنوان نوعی که هرگز در تشکیل هیچ توده متراکمی شرکت نمی کند، توصیف شده است. مطالعات دیگر گزارش کرده اند که نوع هموسیت درگیر در کپسول گذاری به راسته حشره بستگی دارد. Dubovskiy و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که سلول های دانه دار اولین سلول هایی بوده که در تماس هستند و در اطراف مهاجم جمع می شوند. بنابراین، پروتئین های لخته کننده را آزاد می کنند تا خاتمه فرآیند تسهیل شود (Dubovskiy et al., 2016; Bouallegui, 2021). در همین زمینه، Jiravanichpaisal و همکاران (۲۰۰۶) متوجه شدند که سلول های دانه دار و نیمه دانه دار شاه میگوی آب

شیرین به طور مشترک در کپسول گذاری درگیر هستند درحالی که هیچ دخالت عملکردی به سلول های هیالین اختصاص پیدا نکرده است (Jiravanichpaisal et al., 2006, Bouallegui, 2021) (شکل ۱).

نقش موثر آینده نگر مسیر تله خارج سلولی مرگ سلولی (ETosis) در کپسول گذاری

گزارش های اخیر مشارکت بالقوه سلول های هیالین (HC) در شروع کپسول گذاری را برجسته کرده است (Robb et al., 2016; Smith, 2014). این یافته از طریق مشارکت سلول های هیالین در اجرای مسیر مرگ سلولی تله خارج سلولی (ETosis) در خرچنگ *Carcinus maenas* نشان داده شده است (Brinkmann et al., 2004; Brinkmann and Zychlinsky, 2012). شایان ذکر است، ETosis پدیده ای است که اولین بار در پستانداران توصیف شده و می تواند به وسیله سلول های التهابی (نوتروفیل ها) و سایر سلول های ایمنی ذاتی پستانداران راه اندازی شود (Rosa and Barracco, 2010; Brinkmann and Zychlinsky, 2012). چنین پدیده ای مستلزم اخراج خارج سلولی کروماتین از هسته با هدف به دام انداختن و کشتن مهاجمان خارجی (باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها و انگل ها) است. ETosis نیاز به دخالت و تولید گونه های فعال کننده مجدد اکسیژن (ROS) از طریق NADPH کمپلکس آنزیمی اکسیداز و میلوپراکسیداز دارد (Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Smith, 2016). این شرایط التهابی به نفع شروع فرآیند با تراکم زدایی هسته در داخل سلول و سپس بیرون انداختن شبکه ابر مانند کروماتین به محیط خارج سلولی به صورت کنترل شده، توصیف شده است. چنین موادی با عوامل ضد میکروبی (به عنوان پپتیدهای ضد میکروبی از گرانول ها و هیستون ها همچنین با عملکردهای ضد میکروبی) همراه است (Poirier et al., 2014). ETosis اخیراً در برخی از بندپایان، دوکفه ای ها و سینی دریان یافت شده است. ثابت شده است که ETosis در خرچنگ از پروهموسیت ها (مشابه HC در شاه میگو) ایجاد می شود. جالب اینجاست که به نظر می رسد، SGC نیز از توانایی انتشار کروماتین برخوردار است. مهم تر از همه، ETosis تا حد زیادی فرآیند کپسول گذاری را از طریق به دام افتادن عوامل بیماری زا به وسیله کروماتین خارج شده را تسهیل می کند و به تشکیل لایه های مسطح هموسیت ها کمک می کند تا نوعی غلاف در اطراف موجودات خارجی با استفاده از

کروماتین خارجی به عنوان یک داربست در اوایل مرحله کپسول گذاری تشکیل دهند. مشخص شده که پروکسی نکتین ها و هیستون ها (عمدتاً H2A) نیز تا حد زیادی در اوایل مراحل کپسول گذاری دخیل هستند. مسیر فرعی ETosis در خرچنگ به عنوان یک استراتژی ایمنی که می تواند بالقوه مطمئن باشد یا حداقل نیاز به شروع از طریق دخالت HC داشته باشد، نیاز به بررسی و تایید دارد (Bouallegui, 2021).

نقش بالقوه هموسیت های بی حرکت در پاسخ ایمنی

در مقابل هموسیت های در گردش خون در بی مهرگان که به عنوان سلول های سرگردان آزاد در همولنف شناخته می شوند، هموسیت های بی حرکت که به عنوان فاگوسیت های ثابت نیز شناخته می شوند، هموسیت هایی هستند که به دلیل سیستم گردش خون باز بی مهرگان، می توانند به بافت ها و اندام های مختلف مهاجرت و در آن جا ساکن شوند. بنابراین، هموسیت های بی حرکت یا بی پایه می توانند در داخل بافت ها ساکن شده و حتی گاهی اوقات در بافت های مختلف (کانال مرکزی آبشش ها، شریان ها و هپاتوپانکراس) تثبیت شوند. اخیراً دخالت چنین سلول هایی در تعیین پاسخ ایمنی مناسب به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته که باعث افزایش یک نقش احتمالی در دفاع ایمنی شده است (Dubovskiy et al., 2016; Koiwai et al., 2019; Koiwai et al., 2018).

چنین هموسیت های محیطی ویژگی های عمومی مشترکی با آنهایی که در گردش خون هستند، دارند، اما برخی از تفاوت ها را نیز در فنوتیپ های سطح سلولی آنها نشان می دهد. به طور کلی، گزارش ویژگی ها و نقش هموسیت های بی تحرک در استراتژی های دفاعی شاه میگوی آب شیرین به بهبود درک پاسخ ایمنی شاه میگوی آب شیرین کمک می کند (Bouallegui, 2021).

سلول های هیالین و نئوپلازی - تداخل با پاسخ سیستم ایمنی

از زمان توسعه سیستم طبقه بندی هموسیت به جمعیت های فرعی در شاه میگوی آب شیرین، با وجود فعالیت فاگوسیتیک بسیار کم آنها، بحث های زیادی در مورد عملکرد سلول های هیالین، وجود داشته است. مطالعات محققان نشان داده است که سلول های هیالین در واقع پروهموسیت های آزاد سرگردانی

هستند که ممکن است، فقط تحت شرایط خاص در گردش خون آزاد شوند.

با این حال، شرایط التهاب مزمن مانند آزادسازی بیش از حد استاکین ۱ (نقش عامل هورمون رشد)، علاوه بر دخالت ثبت شده PDGF factor در فرآیندهای علامت دهی (سیگنالینگ)، ممکن است باعث تحریک یک مقطع رگ‌زایی، به نفع ظهور ویژگی‌های نفوپلاستیک شود. شایان ذکر است که سلول‌هایی با اشکال عجیب و غریب که نشانه شروع و وقوع نفوپلازی در سخت پوستان باشد، قبلاً گزارش شده است که ممکن است به عنوان یک فرآیند بالقوه‌ای که از دست دادن ظرفیت ایمنی هموسیت‌ها به رغم بازیابی ثبت شده از نظر تعداد (افزایش THC پس از عفونت یا چالش در سناریوهای مختلف) را توضیح دهد، فرض شود. متأسفانه نفوپلازی در شاه میگوی آب شیرین و سخت پوستان به طور کلی، زیاد مورد مطالعه قرار نگرفته است. کمبود اطلاعات در مورد تومورها در سخت پوستان به فقدان توصیف دقیق به‌وسیله آسیب‌شناسان باتجربه سخت پوستان و در اکثر موارد فقدان گزارش آزمایش‌های آسیب‌شناسی بافتی نسبت داده

شده است. ویژگی‌های نفوپلاستیک بیشتر خود را به صورت ندول‌های حاوی سلول‌های غول پیکر متعدد یا آناپلاستیک و هیپرتروفی شده با یک هسته بزرگ یا چند هسته کوچک نشان می‌دهند. در سطح بافتی، ضایعات بافتی احتمالی بهم ریختگی ساختاری و مقادیر بالای سلول‌های پلئومورفیک تمایز نیافته با هسته هیپرتروفی شده و هسته‌های برجسته، علاوه بر اشکال میتوزی چند قطبی عجیب و غریب گزارش گردیده است (Bouallegui, 2021).

اجزاء مولکولی مصونیت شاه میگوی آب شیرین

گیرنده‌های تشخیص الگو (PRR)

فعال‌سازی یک پاسخ ایمنی موثر، نیاز به فرآیند مشارکتی اجزای مولکولی در سه سطح مکانیکی دارد که عبارتند از فرآیند شروع، انتشار پاسخ از طریق شبکه سازی سیگنال و در نهایت، تحریک مولکول‌های عامل برای خنثی کردن عوامل بیماری‌زاست. این چرخه به‌خوبی در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴: اجرای پاسخ ایمنی شاه میگوی آب شیرین. هماهنگی پاسخ ایمنی در سطح مولکولی (Bouallegui, 2021)

بیماری‌زا از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها دارند. چندین گیرنده Toll و پروتئین‌های مرتبط در شاه میگوهای مختلف آب شیرین، برای مثال گیرنده 3 Toll از *A. astacus* (PcToll1,2,3,4,5,6) از *Procambarus clarkii* (Jiravanichpaisal et al., 2007; Wang et al., 2016; Theissinger et al., 2015). PRRs شاه میگو نشان‌دهنده لکتین‌ها به عنوان یک دسته مهم از مولکول‌ها با نقش شناسایی غیر خودی هستند. با این حال، لکتین‌ها پروتئین‌هایی هستند که با استفاده از یک دامنه شناسایی کربوهیدرات (CRD) به قند متصل می‌شوند. در واقع، در میان

با این حال، مرحله شروع شامل یک شناخت دقیق عوامل بیماری‌زا یا دیواره‌های سلولی مرتبط با آنها (PAMPs) مانند LPS و β -glucans به‌وسیله گیرنده‌های سلولی/اپیتلیوم روی سطوح خارجی، غنی شده با اجزاء ایمنی ذاتی (PRRs) است. بسیاری از PRRs به این ترتیب در شاه میگوهای آب شیرین مانند گیرنده‌های toll like، پروتئین‌های اتصال‌دهنده β -glucan (LGBP)، لکتین‌ها، اینتگرین‌ها و مولکول‌های چسبنده سلولی سندرم داون (Dscams) شناسایی شده‌اند. خوشبختانه، TLRs یکی از خانواده‌های به‌خوبی محافظت شده از PRRs هستند که یک نقش شناخت رده‌های مختلف عوامل

۱۳ رده حیوانی لکتین شناسایی شده (با توجه به ویژگی‌های ساختاری آنها)، گزارش شده است که لکتین‌های شاه میگو به حداقل سه گروه ساختاری تعلق دارند. $Pc-Lec2,3$ از *P. clarkii* به عنوان لکتین‌های نوع C (Wang et al., 2011; Huang and Ren, 2020)، PcL -لکتین از *P. clarkii* به عنوان لکتین‌های نوع L (Dai et al., 2016) و $PIFLP1,2$ از *Pacifastacus leniusculus* به عنوان لکتین‌های فیکولین‌مانند (Wu et al., 2011).

به دلیل نقش آنها در فعال کردن سیستم LGBP، ProPO، بیشترین نوع PRRs مطالعه شده و مشخص شده است که متعلق به خانواده پروتئین مربوط به $\beta-3-1$ -گلوکاناز (BGRP) است که در شناخت طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا، از جمله باکتری‌ها و قارچ‌هایی مانند *A. astaci*، عامل ایجاد کننده بیماری طاعون در شاه میگو شرکت می‌کند (Huang and Ren, 2020). علاوه بر این، مولکول‌های چسبندگی سلولی سندرم داون (Dscam)، بزرگترین اعضای فوق خانواده Ig (IgSF)، در بند پایان از جمله سخت پوستان شناسایی شده‌اند (Ng and Kurtz, 2020). شایان ذکر است که Dscam می‌تواند هزاران مورد ایزوفرم تولید کند (Li et al., 2018). Dscam، به اشکال متصل به غشاء و محلول است (mDscam و sDscam)، که فقط به وسیله وجود یا فقدان مناطق دم غشایی و سیتوپلاسمی قابل تشخیص هستند. مطالعات در خرچنگ دستکش چینی (*Eriocheir sinensis*)، نشان داد که اتصال جایگزین Dscam می‌تواند ایزوفرم‌های خاص عامل بیماری‌زا با اپی‌توپ‌های متنوع در پاسخ به چالش ایمنی ایجاد کند که به طور بالقوه قادر به تشخیص طیف گسترده لیگاند هاست.

در واقع، Li و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که بیان mRNA و پروتئین EsDscam به طور معنی‌داری پس از مواجهه باکتریایی در سطح بالاتری تنظیم شده و منجر به تولید ایزوفرم‌هایی می‌شود که به طور اختصاصی با باکتری‌های اصلی متصل می‌شوند تا پاکسازی کارآمد از طریق فاگوسیتوز به وسیله هموسیت‌ها را تسهیل کنند (Li et al., 2019). روشن کرده‌اند که ایزوفرم‌های محلول Dscam به طور اختصاصی با باکتری‌های اصلی از طریق اپی‌توپ II متصل می‌شوند و سپس با Dscam متصل به غشاء واکنش نشان می‌دهند که از طریق اپی‌توپ I مناطق خارج سلولی یکسانی را به اشتراک می‌گذارند تا فاگوسیتوز را افزایش دهند. سازوکارهای انتقال سیگنال آبخاری که پس از اتصال Dscam به عامل بیماری‌زا فعال می‌شوند، به

طور کامل مشخص نشده است. Dscams در شاه میگوای آب شیرین (*Cherax quadricarinatus* و *P. leniusculus*)، ثبت شده است و به عنوان نامزدهای کلیدی برای سیستم گیرنده از نظر جسمی (بدنی) متنوع پیشنهاد شده‌اند. تصور می‌شود که گیرنده تشخیص الگوی بیش از حد متغیر در ایمنی شاه میگو، نقش گیرنده سطح سلولی را بازی می‌کند که فاگوسیتوز و آپسونین‌ها را به دلیل تشخیص ایزوفرم‌های محلول Dscam در همولنف سخت‌پوستان تحریک می‌کند (Armitage et al., 2015; Ng and Kurtz, 2020). چنین یافته‌هایی دخالت احتمالی Dscams را به عنوان عوامل ایمنولوژیک که از طریق توانایی آنها در تولید دامنه Ig با ترکیبات متغیر برای ارتقای اختصاصی بودن شناخت و اتصال به انواع عوامل بیماری‌زا از طریق چنین ظرفیت اتصال، حافظه ایمنی را تقویت می‌کنند، برجسته می‌سازد (Chang et al., 2018; Huang and Ren, 2020).

میانجی‌ها و وقف‌دهنده‌های علامت‌دهنده

یک مرحله شناسایی موفق که به وسیله اعضای PRR انجام می‌شود، چندین واکنش پایین‌دستی را با هدف انتشار علامت‌های پاسخ ایمنی فعال می‌کند. انجام چنین شبکه‌ای از طریق انبوهی از عوامل واسطه و مولکول‌های واسطه از مسیر Toll، مسیر نقص ایمنی (IMD)، مسیرهای Janus kinase signal، مسیرهای فعال کننده رونویسی (JAK/STAT)، مسیرهای پروتئین کینازهای فعال شده با میتوزن (MAPKs) و شبکه سیتوکین مانند، اطمینان حاصل می‌شود. رونوشت‌های زیادی که به مسیرهای Toll اختصاص یافته، برای *A. astacus* ثبت شده‌اند (Theissinger et al., 2016). تا کنون، بسیاری از همولوگ‌های با میانجی‌گری Toll و اجزاء مسیر سیگنالینگ، مانند مسیر سیگنالینگ (TLR4)، سیتوزولی آداپتور $PcMyD88$ ، عامل نکروز تومور ۶ ($PcTRAF6$) و ($PcATF4$) در شاه میگوی باتلاقی قرمز *P. clarkii* شناسایی شده است (Lan et al., 2013; Huang et al., 2018). با این حال، برخی از اجزاء کلیدی دیگر که در سیگنال دهی TLR4 ضروری است (IRB ، $TAK1$ ، $TRAF6$ ، $JRAK1$ ، $JRAK4$) یا هم‌تایان مربوطه آنها، در سخت‌پوستان ناشناس باقی می‌مانند (Huang and Ren, 2020). علاوه بر این، وجود برخی مولکول‌های میانجی دیگر متعلق به سایر مسیرهای سیگنالینگ مانند مسیر IMD، مسیرهای JAK/STAT و MAPK، در مطالعاتی که

به عمل آمده است، مصونیت علیه باکتری‌های گرم منفی را روشن می‌کند و محرک دفاع از طریق گیرنده‌های پپتیدوگلیکان (PG) و در پاسخ به ویروس سندروم لکه سفید (WSSV) در *P. clarkii* را روشن می‌سازد (Huang and Ren, 2020). چالش سندروم ویروس لکه سفید، بیان PcIMD را تعدیل می‌کند. همچنین گزارش شده است که مسیر IMD که دارای عملکرد حفاظت شده برای تنظیم بیان پپتیدهای ضد میکروبی (AMP) در شاه میگو در برابر باکتری‌های گرم منفی است، در تنظیم بیان کراستین‌ها و ژن‌های لیزوزیم در برابر ویروس سندروم لکه سفید نقش دارد (Lan et al., 2013). علاوه بر این، ثابت شده است که سه ایزوفرم cDNA مختلف به عنوان PcSTATa، PcSTATb، و PcSTATc، متعلق به مسیر JAK/سیگنالینگ STAT نقش مهمی در برابر ویروس سندروم لکه سفید در شاه میگوی باتلاقی قرمز *Procambarus clarkii* به وسیله تعدیل سطح بیان عوامل آنتی لیپوپلی ساکارید (PcALF1، PcALF2، PcALF3، PcALF4، PcALF5، و PcALF6) و کروستین (PcCrus1، PcCrus2، PcCrus3، و PcCrus4) ایفا می‌کند (Huang and Ren, 2020). علاوه بر این، دخالت MAPKinase-p38، متعلق به پروتئین کینازهای سرین/ترونین (MAPKs) (ERKs)، JNKs و p38s، در تحریک پاسخ سیستم ایمنی در *P. clarkii* به عنوان نتایج مواجهه با کادمیوم نشان داده شده است. بدین ترتیب، MAPKs می‌توانند به وسیله موارد مختلف تحریکات خارج سلولی (سیتوکین‌های التهابی، عفونت‌های عامل بیماری‌زا و استرس محیطی) تحریک شوند (Shen et al., 2014).

عناصر موثر ایمنی

اجزاء ایمنی منجر به انجام دفاع عملکردی در برابر عوامل بیماری‌زا، مانند سیستم پروفنول اکسیداز و مولکول‌های فعال‌کننده مرتبط با آنها مانند پروتئازهای سرین و مهارکننده‌های پروتئازها، همراه با واسطه تنظیم‌کننده آنها می‌شود. سیستم پروفنول اکسیداز، آنزیم فنل اکسیداز حاوی مس را برای اکسید کردن فنل‌ها به کینون‌ها فعال می‌کند که به نوبه خود به ملانین کاتالیز می‌شود. مشخص شده است که این روند در بهبود زخم و کپسول‌گذاری به عنوان بخشی از دفاع ضد قارچی دخالت می‌کند.

AMPs پلی‌پپتیدهای کاتیونی کوچکی هستند که به طور گسترده توزیع شده‌اند و اثر ضد بیماری‌زایی بر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا دارند. AMPs سخت‌پوستان را می‌توان با توجه به ترکیبات اسید آمینه و خواص ساختاری آنها به طور کلی به چهار گروه دسته بندی کرد: ۱) AMPs دارای ساختار آلفا-مارپیچ خطی آمفی پاتیک تک دامنه، از جمله آستاسیدین‌ها که پپتیدهای غنی از پرولین مانند آستاسیدین ۲ از *P. leniusculus* و *Pc-astacidin* از *P. clarkii* هستند. ۲) پپتیدهای تک دامنه غنی شده با بقایای سیستمین که قادر به تشکیل حداقل یک پل دی سولفیدی بین صفحات B هستند. ۳) AMPs با پپتیدهای آلفا-مارپیچ خطی چند دامنه‌ای غنی شده با برخی از اسیدهای آمینه، به طور کلی باقی مانده‌های پرولین یا گلیسین، از جمله کروستین‌ها، مشخص شده توسط دامنه (بازوی) پروتئین اسیدی خود (WAP) در C-پایانه، مانند P. leniusculus، و P. crustin 1,2 در Pccrustin4، و *P. clarkii* و پروکامبارین‌ها، پپتید غنی از گلیسین در *P. clarkia* شرح داده شده است و ۴) AMPs غیر متعارف شامل پروتئین‌ها/قطعات پروتئینی با عملکردهای ضد میکروبی مانند هیستون‌های H2A و عوامل ضد لیپوپلی ساکارید (ALFs) دارد. در نهایت، حداقل دو نوع از لیزوزیم‌های بی‌مهرگان (i-types)، Pclysi 1,2 در *P. clarkii* شناسایی شده‌اند. با این حال، همه انواع لیزوزیم توصیف شده در سخت‌پوستان از نوع مرغی (نوع C) هستند. لیزوزیم‌ها عوامل مهمی با عملکرد ضد میکروبی هستند که به وسیله فعالیت مورامیداز، هیدرولیز 4-b-1 پیوند گلیکوزیدی بین N-استیل مورامیک اسید- acetyl-glucosamine آنها تعریف می‌شوند. بنابراین، باعث لیز دیواره‌های پپتیدوگلیکانی باکتریایی می‌شود (Bouallegui, 2021).

استرس در شاه میگوی آب شیرین

استرس به عنوان وضعیتی ناشی از شرایط محیطی تهدیدکننده حیات تعریف می‌شود. شرایطی که حیات را تهدید نمی‌کنند، ولی به تغذیه، رشد، تولید مثل یا سایر جنبه‌های اعمال عادی، فیزیولوژی و فعالیت حیوان آسیب می‌رسانند، استرس‌زا هستند. تحریکاتی که این تغییرات را به وجود می‌آورند، همگی به عنوان استرس‌زاها نامیده می‌شوند. چنین استرسی می‌تواند موجب کاهش تولید در سطح آزمایشگاه شود و در آبریز پروری

مرگ‌ومیرهای سریع یا با تأخیر ایجاد کند و اغلب سبب واکنش‌های تغذیه‌ای ضعیف برای یک یا چند روز می‌شود و در نتیجه رشد کندتر و بازده رشد کمتر خواهد شد. علاوه بر میانجی‌های استیل کولین و نورآدرنالین موجود در سلول‌های عصبی، در سخت پوستان ۵-هیدروکسی تریپتامین، گلوتامات و انتقال‌دهنده‌های شبه پلی‌پتیدی به کار می‌روند (میرزرگر و صیدگر، ۱۳۸۴).

مقاومت در برابر استرس و بیماری در شاه میگوی آب شیرین

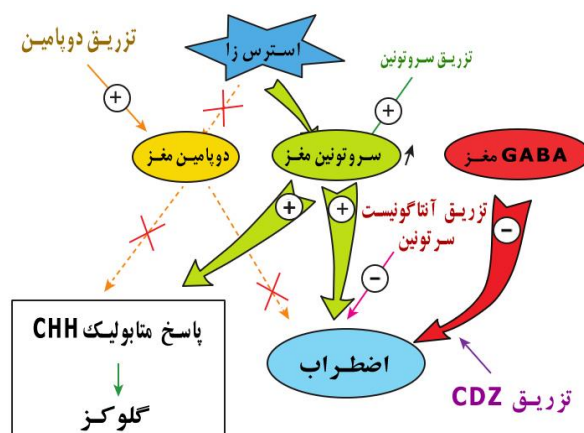
استرس و بیماری از عوامل تاثیرگذار بر توسعه صنعتی شاه میگوی آب شیرین محسوب می‌شوند. پرورش شاه میگوی مقاوم در برابر استرس و بیماری می‌تواند بر این محدودیت‌ها غلبه کند و توسعه صنعتی آن را ارتقاء بخشد. امروزه شاه میگوی منتخب پرورشی (*Procambarus clarkii*) نسل سه (F3) که رشد سریع و ترکیب هاپلوتا‌پ مطلوبی از ژن‌های ایمنی ALF, R, و crustin2 که به ترتیب گیرنده toll مانند، عامل ضد پلی ساکارید و پپتید ضد میکروبی را کد می‌کنند، به عنوان والدین برای پرورش فرزندان توصیه می‌شود. بهگزینی نژاد مطلوب عامل مهمی در توسعه صنعت تولید شاه میگو محسوب می‌شود. نسبت هاپلوتا‌پ مطلوب در شاه میگوی منتخب بیشتر از شاه میگوی غیر منتخب است که منجر به مقاومت شدیدتر در برابر استرس و بیماری می‌شود. در مقایسه با شاه میگوی غیر منتخب، میزان مرگ‌ومیر شاه میگوی منتخب نژاد Huachizhen-1 قرار گرفته در معرض استرس در طول ۸ روز حمل‌ونقل و چالش با باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* و *Vibrio parahaemolyticus* یا ویروس سندروم لکه سفید به طور قابل توجهی به ترتیب ۶۰ درصد و ۲۰ درصد کاهش نشان می‌دهد. همچنین نسبت ژنوتیپ‌های هموزیگوت نامطلوب ALF, R و crustin2 به شدت کاهش یافته درحالی‌که ژنوتیپ‌های هتروزیگوت همراه با مقاومت در برابر بیماری و استرس در حین بلوغ شاه میگو در شرایط طبیعی افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد، هتروزیگوت‌های این ژن‌ها مقاومت قوی در برابر بیماری و استرس نشان می‌دهند. بنابراین، شاه میگوی نژاد Huachizhen-1 برای بهبود مقاومت در برابر بیماری و استرس و تولید اقتصادی شاه میگو مناسب‌تر است. بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا، شامل *Aeromonas hydrophila* و *Vibrio parahaemolyticus* و ویروس سندروم لکه سفید، اغلب حین پرورش شاه میگو رخ می‌دهند. مرگ‌ومیر شاه میگوهای آلوده به

باکتری‌های گرم منفی *Vibrio parahaemolyticus* یا *Aeromonas hydrophila* همراه با آسیب روده، کاهش تغذیه و فعالیت اغلب در عرض ۵ روز به ۹۰ درصد می‌رسد. ویروس سندروم لکه سفید یک باکولو ویروس با طیف گسترده میزبانی، راه‌های انتقال متعدد و میزان مرگ‌ومیر بالاست. توسعه زنجیره صنعتی ارزش شاه میگو در ممانعت از ایجاد بیماری به‌وسیله این عوامل بیماری‌زا حائز اهمیت است. با وجود پیشرفت‌های حاصله در پیشگیری و کنترل بیماری با استفاده از روش‌ها و فنون پیشرفته پرورشی، این بیماری‌ها از بین نرفته و منجر به مرگ‌ومیر بالای شاه میگوها به‌ویژه در مرحله جوانی و کاهش تولید در واحد سطح می‌شوند. به‌علاوه، تازگی محصولات آبی بر طعم و مزه تاثیر دارد. گسترش دامنه جغرافیایی حمل‌ونقل شاه میگوی تازه می‌تواند بازار مصرف و در نتیجه زنجیره ارزش صنعتی را توسعه دهد. با این حال، مرگ‌ومیر بالا و کیفیت پایین شاه میگوهای تحت استرس پس از حمل‌ونقل، توسعه زمان و مسافت حمل‌ونقل شاه میگوی تازه را محدود می‌سازد. صنعت تخم‌آزبان پایه و اساس آبی پروری است و پرورش شاه میگوهای مقاوم در برابر استرس و بیماری می‌تواند بر محدودیت‌های مذکور غلبه کند. پرورش دورگه گیری، روشی حیاتی برای پرورش شاه میگوی مقاوم به بیماری است. ولی منابع سلول‌های جنسی و تنوع ژنتیکی شاه میگو محدود است و اصلاح دورگه گیری هتروزیگوتی در شاه میگو را محدود می‌سازد. به‌علاوه، راهکارهای تکثیر بر اساس انتخاب فنوتیپی زمان‌بر هستند و کارایی کمتری نسبت به روش‌های تکثیر مولکولی و توالی‌یابی ژنومی دارند. گیرنده‌های شبه toll، پپتیدهای ضد میکروبی و عامل ضد لیپو پلی ساکارید پروتئین‌های ایمنی حیاتی در شاه میگو هستند. سه ژن کدکننده پروتئین (ALF, R, و crustin2) دارای تنوع ژنتیکی متعدد در بین ژرم پلاسماهای شاه میگوهای مختلف با تفاوت‌های زیادی در میزان مقاومت در برابر بیماری در هاپلوتا‌پ‌های مختلف ژنی هستند. برای تولید یک نژاد شاه میگو با فنوتیپ منتخب مطلوب مقاومت در برابر بیماری و رشد سریع، می‌توان از شاه میگوی نسل ۳، از طریق بهگزینی فنوتیپی برای رشد سریع به عنوان جمعیت پایه برای انتخاب والدین با هدف اصلاح صفات مقاومت در برابر بیماری با استفاده از روش‌های مولکولی نشانگرهای پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و تلاقی برای تولید نسل مقاوم در برابر استرس و بیماری برای کاهش مرگ‌ومیر و افزایش تولید و

افزایش زمان و مسافت حمل و نقل استفاده نمود (Ren et al., 2023).

سروتونین اما نه دوپامین، پاسخ استرس و رفتار اضطرابی را در شاه میگوی آب شیرین (*Procambarus clarkii*) کنترل می‌کند. در فرمانروی حیوانات، آمین‌های بیولوژیک تعدیل‌کننده‌های گسترده سیستم عصبی بوده که اغلب برای کنترل خلق و خو در تعامل هستند. استرس باعث القاء تغییراتی در غلظت سروتونین مغز (5-HT) که مسئول بروز رفتار اضطرابی (ALB) است، می‌شود. شدت رفتار اضطرابی شاه میگو به میزان شدت تحریک استرس‌زا بستگی دارد و با افزایش غلظت 5-HT در مغز همراه است. این مقادیر 5-HT به طور قابل توجهی، به قبل و بعد از استرس مرتبط است در حالی که مقادیر دوپامین تقریباً ۳-۵ برابر کمتر است. با این حال، مقدار رفتار اضطرابی به وضوح با غلظت سروتونین مغز (5-HT) در ارتباط بوده و به طور قابل توجهی با دوپامین همبستگی نداشته است. در مقایسه با تزریق سروتونین (5-HT)، تزریق دوپامین قادر به برانگیختن پاسخ به استرس یا رفتار اضطرابی نبود. علاوه بر این، مقادیر سروتونین و دوپامین با درمان به وسیله کلردیازپوکساید ضد اضطراب اصلاح نشد که تایید می‌کند، سرکوب رفتار اضطرابی به وسیله این لیگاند گیرنده GABA-A در پایین دست عمل می‌کند و مستقل از تغییرات مقادیر بیوآمین شاه میگو است. همچنین می‌توان با تزریق اولیه آنتاگونیست‌های سروتونین 5-HT از اثرات اضطراب‌زایی 5-HT جلوگیری نمود. در مجموع، افزایش غلظت 5-HT مغز و نه دوپامین در کنترل القاء و شدت رفتار اضطرابی شاه میگو نقش دارد (Fossat et al., 2015).

همه حیوانات زنده با خطر مواجه هستند و راهکارهایی را برای اجتناب از موقعیت‌های بالقوه زیان‌آور اتخاذ می‌کنند. وجود خطر یک پاسخ به استرسی را بر می‌انگیزد که ممکن است منجر به واکنش غیر ارادی فرار، رفتار یخ زدگی / ثابت ماندن در جا یا پرخاشگری شود و نیاز به بسیج ذخایر انرژی تحت کنترل هورمونی دارد. هنگامی که استرس طولانی شود، می‌تواند باعث ایجاد رفتارهای سازگار شونده طولانی مدت شود که منجر به یک دله‌ره پایدار نسبت به محیط اطراف شود که حتی در یک زمینه جدید و عدم وجود عامل بیماری‌زا ادامه دارد. این سطح بالاتر هوشیاری اضطراب نامیده می‌شود. مشخص شده است که رفتار اضطرابی در سخت پوستان نیز قابل مشاهده است. سیستم‌های مونوآمینرژیک در هماهنگی پاسخ به استرس دخالت می‌کنند. به طور خاص، آمین‌های بیوژنیک سروتونین و دوپامین در پاسخ‌های ترس و اضطراب در پسانداران نقش دارند. در شاه میگو و سایر ده‌پایان نشان داده شده است که سروتونین پاسخ به استرس را با افزایش ترشح هورمون‌های هیپرگلیسمی سخت پوستان (CHHs) کنترل می‌کند که منجر به افزایش گلوکز خون می‌شود. همچنین ادعا شده که دوپامین دارای چنین نقشی است، اگرچه مشاهدات متناقضی گزارش شده است. پایین دست از پاسخ به استرس، سروتونین قادر به تحریک رفتار اضطرابی در شاه میگو بوده اما نقش احتمالی دوپامین در این رفتار هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است (شکل ۵).



شکل ۵: نمودار شماتیک کنترل استرس و رفتار اضطرابی در شاه میگو پس از تجربه یک موقعیت استرس‌زا (استرس)، سروتونین در مغز شاه میگو افزایش می‌یابد در حالی که دوپامین تقریباً ثابت می‌ماند. افزایش سروتونین مسئول تحریک: ۱- یک پاسخ متابولیک است که با افزایش گلوکز همولف، احتمالاً از طریق کنترل هورمون‌های هیپرگلیسمی سخت پوستان (CHHs) مشخص می‌شود. ۲- رفتار اضطراب گونه (اضطراب) در حالی که تزریق سیستمیک سروتونین باعث افزایش میزان سروتونین مغز می‌شود و بدین ترتیب، هر دو پاسخ فعال می‌شود، هیچ کدام از آنها با افزایش دوپامین مغز بعد از تزریق سیستمیک دوپامین برانگیخته نشدند. تزریق کلردیازپوکساید (CDZ)، یک ضد اضطراب شناخته شده برای تقویت اثرات GABA بر گیرنده‌های GABA-A، رفتار اضطرابی را بعد از استرس سرکوب می‌کند، اما بر سایر سطوح این برنامه تأثیری ندارد (Fossat et al., 2015).

آینده پژوهی

این بررسی دانش گسترده و به روزی را در خصوص اجزاء مولکولی ایمنی شاه میگو با هدف درک مکانیسم‌های دفاعی برای مقابله با بیماری، برای افزایش مقاومت شاه میگوهای بومی در خطر انقراض ارائه می‌دهد. متأسفانه استراتژی‌های پیشگیرانه مقدماتی (تقویت پاسخ‌های ایمنی شاه میگو)، به طور منصفانه کاوش نشده‌اند. ارزیابی پاسخ‌های ایمنی شاه میگو را باید با توجه به به‌روز رسانی‌های اخیر مسیرها و فرآیندهای سیگنال‌دهی درگیر در دفاع‌های مختلف ضد عوامل بیماری‌زا در نظر گرفت. آنچه که به عنوان فعل و انفعالات میزبان و عامل بیماری‌زا به عنوان عامل زمینه‌ای موثر بر تعدیل یک پاسخ ایمنی اثربخش توصیف می‌شود. با این حال، Zheng و همکاران (۲۰۲۰) دخالت مسیرهای Toll در تشخیص زودهنگام عفونت قارچی، حتی قبل از نفوذ عامل بیماری‌زا به کوتیکول میزبان را نشان دادند. *Locusta migratoria manilensis* می‌تواند مسیر سیگنالینگ Toll را با تنظیم مثبت اعضای Spaetzle و Cactus بالادست PRRs مسیر Toll به دنبال چالش به‌وسیله ۱-b، ۳-glucan (لامینارین) از دیواره سلولی قارچ *Metarhizium acridum* زمانی که بر کوتیکول میزبان اعمال شود، حتی قبل از نفوذ قارچ فعال کند. چنین یافته‌هایی راه را برای ادامه مسیر تحقیقات با در نظر گرفتن موارد توضیح داده شده مسیرهای سیگنالینگ مختلف در شاه میگو را برای افزایش درک ما از تعاملات میزبان و عامل بیماری‌زا در حل معضل بیماری طاعون شاه میگو هموار می‌کند. درک اهمیت دفاع سلولی در مقابل دفاع هومورال در پاسخ ایمنی شاه میگو مورد نیاز است. این نشان می‌دهد که باید تأکید بیشتری در درک مکانیسم‌های مولکولی نهفته سلولی درگیر در دفاع ایمنی ذاتی گونه‌های حساس شاه میگو به‌عمل آید. چنین امری ممکن است پایه‌ای برای ارزیابی گسترده‌تر برای غلبه بر محدودیت‌های فعلی در شکل‌گیری استراتژی‌های پرایمینگ ایمنی در برابر *A. astaci* و تقویت تلاش برای حفاظت از گونه‌های در حال انقراض باشد. در این زمینه، دستاورد آینده‌نگر از یک پاسخ ایمنی خاص، به نام حافظه ایمونولوژیک ایمنی ذاتی، در بسیاری از بی‌مهرگان، از جمله سخت پوستان اثبات شده است. با این حال، رمزگشایی مکانیسم‌های چنین حافظه‌ای هنوز به طور کامل انجام نشده

است. بررسی مولکولی زیربنای اصلی پیشنهاد مکانیکی برنامه‌ریزی مجدد یا اصلاح اپی ژنتیکی بیان ژن به دلیل عوامل مختلف غیر از جهش‌های DNA است. برای این منظور، یک هدف فراگیر با هدف بررسی تغییرات زیربنایی در مکانیسم‌های مولکولی مصونیت شاه میگوی آب شیرین، با کاوش انتقال بالقوه صفات مقاومت در بین نسل‌ها در برابر *A. astaci*، ممکن است برنامه‌های پرورش و تولید شاه میگو در اسارت و افزایش حفاظت از شاه میگو را توسعه دهد (Bouallegui, 2021). شرایط استرس مراقبت مادری را افزایش می‌دهد و رشد و نمو شاه میگوهای نوجوان را به تاخیر می‌اندازد. در واقع، شاه میگوهای مولد ماده از فرزندان خود مطابق با شرایط مراقبت می‌کنند تا دوره ایمن طولانی‌تری را برای آنها در شرایط نامطلوب (کمبود غذا، حجم کم آب) فراهم کنند. این امکان وجود دارد که با دستکاری فرمون‌های مادری بتوان میزان رشد را دستکاری نمود (Kaur et al., 2024).

منابع

- Armitage, S.A.O., Peuß, R. and Kurtz, J., 2015. Dscam and Pancrustacean Immune Memory - a Review of the Evidence. *Developmental and Comparative Immunology*. 48(2):315–23. DOI: 10.1016/j.dci.2014.03.004.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T., 1999. Histopathology in Fish: Proposal for a Protocol to Assess Aquatic Pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22(1):25–34. DOI:10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- Bouallegui, Y., Ben-Younes, R., Bellamine, H. and Oueslati, R., 2018. Histopathological Indices and Inflammatory Response in the Digestive Gland of the Mussel *Mytilus Galloprovincialis* as Biomarker of Immunotoxicity to Silver Nanoparticles. *Biomarkers*, 23(3):277–87. DOI:10.1080/1354750X.2017.1409803.

- Bouallegui, Y., 2021.** A Comprehensive Review on Crustaceans' Immune System with a Focus on Freshwater Crayfish in Relation to Crayfish Plague Disease. *Frontiers in Immunology*. 12:667787. DOI:10.3389/fimmu.2021.667787.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S. et al., 2004.** Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663):1532–5. DOI:10.1126/science.1092385.
- Brinkmann, V. and Zychlinsky, A., 2012.** Neutrophil Extracellular Traps: Is Immunity the Second Function of Chromatin? *Journal of Cell Biology*. 198(5):773–83. DOI:10.1083/jcb.201203170.
- Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Söderhäll, I. and Söderhäll, K., 2003.** Host Prophenoloxidase Expression in Freshwater Crayfish is Linked to Increased Resistance to the Crayfish Plague Fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cellular Microbiology*. 5:353–7. DOI:10.1046/j.1462-5822.2003.00282.x.
- Cerenius, L., Andersson, M.G. and Söderhäll, K., 2008.** *Aphanomyces astaci* and Crustaceans Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools. K Lamour, S Kamoun, editors. United States: John Wiley & Sons, Inc. p. 425–33. DOI:10.1002/9780470475898.ch21.
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B.L., Nonaka, M. and Söderhäll, K., 2010.** Proteolytic Cascades and Their Involvement in Invertebrate Immunity. *Trends in Biochemical Sciences*. 35(10):575–83. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.04.006.
- Cerenius, L. and Söderhäll, K., 2018.** Arthropoda: Pattern Recognition Proteins in Crustacean Immunity. In: EL Cooper, editor. *Advances in Comparative Immunology*. Cham: Springer p. 213–24. DOI:10.1007/978-3-319-76768-0.
- Cerenius, L. and Söderhäll, K., 2018.** Crayfish Immunity – Recent Findings. *Dev Comp Immunol.*, 80:94–8. DOI:10.1016/j.dci.2017.05.010.
- Chang, Y.H., Kumar, R., Ng, T.H. and Wang, H.C., 2018.** What Vaccination Studies Tell Us About Immunological Memory Within the Innate Immune System of Cultured Shrimp and Crayfish. *Developmental and Comparative Immunology*. 80:53–66. DOI:10.1016/j.dci.2017.03.003.
- Dai, Y., Wang, Y., Zhao, L., Qin, Z., Yuan, J., Qin, Q., et al., 2016.** A Novel L-type Lectin was Required for the Multiplication of WSSV in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish and Shellfish Immunology*. 55:48–55. DOI:10.1016/j.fsi.2016.05.020.
- Dubovskiy, I.M., Kryukova, N.A., Glupov, V.V. and Ratcliffe, N.A., 2016.** ‘Encapsulation and Nodulation in Insects. *Invertebrate Survival Journal*. 13:229–46. DOI:10.25431/1824-307X/isj.v13i1.229-246.
- Edgerton, B.F., Henttonen, P., Jussila, J., Mannonen, A., Paasonen, P., Taugbol, T., et al., 2004.** Understanding the Causes of Disease in European Freshwater Crayfish. *Conservation Biology*. 18:1466–74. DOI:10.1111/j.1523-1739.2004.00436.x.
- Fossat, P., Bacqué -Cazenave, J., De Deurwaerdère, Ph., Cattaert, D. and Delbecque, J.P., 2015.** Serotonin, but not dopamine, controls the stress response and anxiety-like behavior in the crayfish *Procambarus clarkii*. *The Journal of Experimental Biology*, 218, 2745-2752. DOI:10.1242/jeb.120550.

- Fu, Y., Huang, X., Zhang, P., Van de Leemput, J. and Han, Z., 2020. Single-Cell RNA Sequencing Identifies Novel Cell Types in Drosophila Blood. *Journal of Genetics and Genomics*. 47:175–86. DOI:10.1016/j.jgg.2020.02.004.
- Huang, Y., Chen, Y., Hui, K. and Ren, Q., 2018. Cloning and Characterization of Two Toll Receptors (PcToll5 and PcToll6) in Response to White Spot Syndrome Virus in the Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii*. *Frontiers Physiology*. 9:936. DOI:10.3389/fphys.2018.00936.
- Huang, Y. and Ren Q., 2020. Research Progress in Innate Immunity of Freshwater Crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*. 104:103569. DOI:10.1016/j.dci.2019.103569.
- Huang, Y. and Ren, Q., 2020. Molecular Cloning and Functional Analysis of Three STAT Isoforms in Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental and Comparative Immunology*. 108:103670. DOI:10.1016/j.dci.2020.103670.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. and Söderhäll, K., 2006. Cell-Mediated Immunity in Arthropods: Hematopoiesis, Coagulation, Melanization and Opsonization. *Immunobiology*, 211(4):213–36. DOI:10.1016/j.imbio.2005.10.015.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1989. Cellular Immunity in Crustaceans and the ProPO System. *Parasitology Today*. 5(6):171–6. DOI:10.1016/0169-4758 (89)90139-7.
- Junkunlo, K., Söderhäll, K., Söderhäll, I., 2020. Transglutaminase 1 and 2 are Localized in Different Blood Cells in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 104:83–91. DOI:10.1016/j.fsi.2020.05.062.
- Jussila, J., Makkonen, J., Vainikka, A., Kortet, R. and Kokko, H., 2011. Latent Crayfish Plague (*Aphanomyces astaci*) Infection in a Robust Wild Noble Cray Fish (*Astacus astacus*) Population. *Aquaculture*, 321(1–2):17–20. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.08.026.
- Kaur, D., Das, K., Kubec, J., and Buřič, M., 2024. Stress conditions extend maternal care and delay juvenile development in crayfish. *Current Zoology*, 2024, XX, 1–8 <https://doi.org/10.1093/cz/zoae017>.
- Kobayashi, M., Johansson, M.W. and Söderhäll, K., 1990. The 76 Kd Cell-Adhesion Factor from Crayfish Haemocytes Promotes Encapsulation In Vitro. *Cell and Tissue Research*. 260(1):13–8. DOI:10.1007/BF00297485.
- Koiwai, K., Kondo, H. and Hirono, I., 2018. The Immune Functions of Sessile Hemocytes in Three Organs of Kuruma Shrimp *Marsupenaeus Japonicus* Differ from Those of Circulating Hemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 78:109–13. DOI:10.1016/j.fsi.2018.04.036.
- Koiwai, K., Kondo, H. and Hirono, I., 2019. Isolation and Molecular Characterization of Hemocyte Sub – Populations in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fisheries Science*. 85:521–32. DOI:10.1007/s12562-019-01311-5.
- Lan, J.F., Zhou, J., Zhang, X.W., Wang, Z.H., Zhao, X.F., Ren, Q. and Wang, J. X., 2013. Characterization of an Immune Deficiency Homolog (IMD) in Shrimp (*Fenneropenaeus Chinensis*) and Crayfish (*Procambarus clarkii*). *Developmental and Comparative Immunology*. 41(4):608–17. DOI:10.1016/j.dci.2013.07.004.
- Lanz, H., Tsutsumi, V. and Aréchiga, H., 1993. Morphological and Biochemical Characterization of *Procambarus clarki* Blood Cells. *Developmental and Comparative*

- Immunology*. 17:389–97. DOI:10.1016/0145-305X(93)90030-T.
- Li, D., Wan, Z., Li, X., Duan, M., Yang, L., Ruan, Z., Wang, Q. and Li, W., 2019.** Alternatively Spliced Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (Dscam) Controls Innate Immunity in Crab. *Journal of Biological Chemistry*. DOI:10.1074/jbc.RA119.010247.
- Li, X.J., Yang, L., Li, D., Zhu, Y.T., Wang, Q., Li, W.W., 2018.** Pathogen Specific Binding Soluble Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (Dscam) Regulates Phagocytosis Via Membrane Bound Dscam in Crab. *Frontiers in Immunology*. 9:801. DOI:10.3389/fimmu.2018.00801.
- Lightner, D.V. and Brock, J.A., 1987.** A Lymphoma-Like Neoplasm Arising from Hematopoietic Tissue in the White Shrimp, *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *Journal of Invertebrate Pathology*. 49(2):188–93. DOI:10.1016/0022-2011(87)90159-5.
- Lin, X. and Söderhäll, I., 2011.** Crustacean Hematopoiesis and the Astakine Cytokines. *Blood*, 117(24):6417–24. DOI:10.1182/blood-2010-11-320614.
- Makkonen, J., Kokko, H., Vainikka, A., Kortet, R. and Jussila, J., 2014.** Dose-Dependent Mortality of the Noble Crayfish (*Astacus astacus*) to Different Strains of the Crayfish Plague (*Aphanomyces astaci*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 115:86–91. DOI: 10.1016/j.jip.2013.10.009.
- Matozzo, V. and Mrin, M.G., 2010.** First Cytochemical Study of Haemocytes from the Crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). *European Journal of Histochemistry*. 54(1):44–9. DOI:10.4081/ejh. 2010.e9 .
- Mirzargar, S.S. and Seidgar, M., 2005.** Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. *University of Tehran Press*. 2734: 227p. (Translated in Persian).
- Ng, T.H. and Kurtz, J., 2020.** Dscam in Immunity: A Question of Diversity in Insects and Crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*. 105:103539. DOI:10.1016/j.dci.2019.103539.
- Nyhlén, L. and Unestam, T., 1980.** Wound Reactions and *Aphanomyces astaci* Growth in Crayfish Cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*. 197:187–97. DOI:10.1016/0022-2011(80)90023-3.
- Oidtmann, B., Heitzl, E., Rogers, D. and Hoffmann, R.W., 2002.** Transmission of Crayfish Plague. *Diseases of Aquatic Organisms*. 52(2):159–67. DOI:10.3354/dao052159.
- Persson, M., Cerenius, L. and Söderhäll, K., 1987.** The Influence of Haemocyte Number on the Resistance of the Freshwater Crayfish, *Pacifastacus leniusculus* dana, to the Parasitic Fungus *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Diseases*. 10(6):471–7. DOI:10.1111/j.1365-2761.1987.tb01098. x.
- Persson, M., Vey, A. and Söderhäll, K., 1987.** Encapsulation of Foreign Particles In Vitro by Separated Blood Cells from Crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Cell Tissue Research*. 247(2):409–15. DOI:10.1007/BF00218322.
- Poirier, A.C., Schmitt, P., Rosa, R.D., Vanhove, A.S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T.P., Charriere, G.M. and Destoumieux-Garzon, D., 2014.** Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate: Evidences in *Crassostrea gigas*. *Journal of Biological Chemistry*.

- 289(36):24821–31. DOI:10.1074/jbc.M114.576546.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P., 1985.** Invertebrate Immunity: Basic Concepts and Recent Advances. *International Review of Cytology*. 97(C):183–350. DOI:10.1016/S0074-7696(08)62351-7.
- Ren, X., Xiong, L., Tan, Y., Liu, X., Zhu, X. and Bai, X., 2023.** Stress and Disease Resistance in Crayfish (*Procambarus clarkii*) Breed “Huachizhen-1”. *Aquaculture Journal*, 3, 7–17. <https://doi.org/10.3390/aquacj3010002>.
- Robb, C.T., Dyrinda, E.A., Gray, R.D., Rossi, A.G. and Smith, V.J., 2014.** Invertebrate Extracellular Phagocyte Traps Show That Chromatin is an Ancient Defense Weapon. *Nature Communications*. 5:1–11. DOI:10.1038/ncomms5627.
- Rosa, R.D. and Barracco, M.A., 2010.** Antimicrobial Peptides in Crustaceans. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2):262–84.
- Shen, H., Hu, Y., Ma, Y., Zhou, X., Xu, Z., Shui, Y., Xu, Z., Shui, Y., Li, Ch., Xu, P. and Sun, X., 2014.** In-Depth Transcriptome Analysis of the Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii*. *PloS One*, 9(10): e110548. DOI: 10.1371/journal.pone.0110548.
- Smith, V.J., Ratcliffe, N.A., 1978.** Host Defense Reactions of the Shore Crab, *Carcinus maenas* (L.), In Vitro. *J Marine Biol Assoc United Kingdom*. 58(2):367–79. DOI:10.1017/S0025315400028046.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K., 1983.** Induction of Degranulation and Lysis of Haemocytes in the Freshwater Crayfish, *Astacus astacus* by Components of the Prophenoloxidase Activating System In Vitro. *Cell and Tissue Research* 233(2):295–303. DOI:10.1007/BF00238297.
- Smith, V.J., 2016.** Immunology of Invertebrates: Cellular. Els. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. p. 1–13. DOI:10.1002/9780470015902.a0002344.pub3.
- Söderhäll, K., Wingren, A., Johansson, M.W. and Bertheussen K., 1985.** The Cytotoxic Reaction of Hemocytes from the Freshwater Crayfish, *Astacus astacus*. *Cellular Immunology*. 94(2):326–32. DOI:10.1016/0008-8749(85)90256-4.
- Söderhäll, I. and Junkunlo, K., 2019.** A Comparative Global Proteomic Analysis of the Hematopoietic Lineages in the Crustacean *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental and Comparative Immunology*. 92:170–8. DOI:10.1016/j.dci.2018.11.016.
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, A. and Petrusek, A., 2017.** Hosts and Transmission of the Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci*: A Review. *Journal of fish diseases*. 40(1):127–40. DOI:10.1111/jfd.12472.
- Tattikota, S.G., Cho, B., Liu, Y., Hu, Y., Barrera, V., Steinbaugh, M.J., Yoon, S.H., Comjean, A., Li, F. and Perrimon, N., 2020.** A Single-Cell Survey of Drosophila Blood. *eLife*, 9:e54818. DOI:10.7554/eLife.54818.
- Theissinger, K., Falckenhayn, C., Blande, D., Toljamo, A., Gutekunst, J., Makkonen, J., Jussila, J., Lyko, F., Schrimpf, A., Schulz, R. and Kokko, H., 2016.** De Novo Assembly and Annotation of the Freshwater Crayfish *Astacus astacus* Transcriptome. *Marine Genomics*, 28:7–10. DOI:10.1016/j.margen.2016.02.006.
- Wang, X.W., Zhang, H.W., Li, X., Zhao, X.F. and Wang, J.X., 2011.** Characterization of a C-type Lectin (PcLec2) as an Upstream Detector in the Prophenoloxidase Activating System of Red

Swamp Crayfish. *Fish and Shellfish Immunology*. 55:241–7.

DOI:10.1016/j.fsi.2010.10.012.

Wang, Z., Chen, Y.H., Dai, Y.J., Tan, J.M., Huang, Y., Lan, J.F., Huang, Y., Lan, J.F. and Ren, Q., 2015. A Novel Vertebrates Toll-like Receptor Counterpart Regulating the Anti-Microbial Peptides Expression in the Freshwater Crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish and Shellfish Immunol.* 43(1):219–29. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.12.038.

Wu, C., Söderhäll, I., Kim, Y.A., Liu, H. and Söderhäll K., 2008. Hemocyte-Lineage Marker Proteins in a Crustacean, the Freshwater Crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Proteomics*, 8(20):4226–35. DOI:10.1002/pmic.200800177.

Wu, C., Söderhäll, K. and Söderhäll, I., 2011. Two Novel Ficolin-Like Proteins Act as Pattern Recognition Receptors for Invading Pathogens in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Proteomics*, 11(11):2249–64. DOI:10.1002/pmic.201000728.

Zheng, X., Li, S., Si, Y., Hu, J. and Xia, Y., 2020. Locust can Detect b-1, 3-Glucan of the Fungal Pathogen Before Penetration and Defend Infection via the Toll Signaling Pathway. *Developmental and Comparative Immunology*. 106:103636. DOI:10.1016/ j.dci.2020.103636.

A review of the immune system and stress resistance of freshwater crayfish

Seidgar M.^{1*}; Nekoueifard A.¹; Jalili R.¹

Corresponding Author: seidgar21007@yahoo.com

1-National Artemia Research Center, Iranian Fisheries Science research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Urmia, Iran

Abstract

Freshwater Crayfish is one of the most valuable and economic fisheries of West Azarbaijan Province, Iran. But unfortunately, with the reduction of reserves since 2014 and the implementation of the fishing ban plan since 2017, the yield from Aras Reservoir Dam is still zero. In this regard, the reproduction and artificial breeding of crayfish with the aim of restoring the reserves and developing native species from the native genetic reserves of the country is important. Therefore, it is essential to know more about the physiology of crayfish, especially the function of the immune system and resistance to stress and disease. Immunity of freshwater crayfish has received much attention due to the urgent need for its conservation. Today, the understanding of the cellular and humoral defense systems of the freshwater crayfish has increased, although the regulatory mechanisms involved in these processes need to be updated. The present study includes an overview of the immunity of freshwater crayfish, including a classification system of hemocyte subtypes, molecular factors involved in hematopoiesis, and the role of hemocyte subpopulations in cellular responses, including hemocyte infiltration, inflammation, encapsulation, and Extracellular Trap cell death pathway (ETosis), as well as the identity and function of hyaline cells, the production of neoplasia, and the emerging topic of the role of sessile hemocytes in peripheral immunity. Stressful conditions increase maternal care and delay the growth and development of juvenile crayfish. Serotonin, but not dopamine, controls stress response and anxiety-like behavior in the freshwater crayfish. To produce a breed of crayfish with the desired phenotype of disease resistance and fast growth, it is possible to improve the disease resistance traits of the parents through phenotypic selection and crossing to produce stress and disease resistant generation to reduce mortality and increase production as well as increasing the time and distance of transportation.

Keywords: Freshwater Crayfish, Hemocytes, Hyaline Cells, Hematopoiesis, Stress