مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال سوم، شماره اول، پیاپی نهم، تابستان ۱۳۹۳ (۶۲-۵۷)

بررسی تغییرات میزان فاکتورهای پلاسمایی در ماهی صبیتی *Sparidentex hasta* بر اثر تغییرات شوری محیطی

آسیه میرعالی[۱]، عبدالعلی موحدی نیا[۲]*، رحیم عبدی[۳]، امیر پرویز سلاطی[۴]
۱، ۲، ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر،
۴. استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۶، تاریخ تصویب: ۹۳/۶/۲۷)

چکیده
۱۴۴ عدد ماهی جوان صبیتی (*Sparidentex hasta*) پس از یک هفته آداپتاسیون با شرایط آزمایشگاه و شوری دریا، در شوری‌های ۵، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ گرم در لیتر قرار داده شد. نمونه‌برداری از ماهیان در۶ مرحله در ساعت ۶، ساعت ۱۲، روز ۱، روز ۲، روز ۷ و روز ۱۴ از آغاز تغییر شوری محیطی انجام شد. نتایج نشان داد سطوح کورتیزول پلاسما در زمان۱۲ ساعت در شوری‌های ۵ و ۶۰ گرم-درلیتر افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های کنترل و شوری ۲۰ گرم‌درلیتر داشت، اما بعد از آن در زمان۲۴ ساعت تا پایان دوره نمونه‌برداری بین شوری‌های مختلف اختلافی مشاهده نشد. میزان گلوکز نیز در تیمارهای ۶۰ و ۵ گرم درلیتر، پس از ساعت۱۲ مواجهه، افزایش معنی‌داری نسبت به ساعات ۶ و ۲۴ نمونه‌برداری نشان داد اما در طول دوره آزمایش در سایر شوری‌ها اختلافی معنی‌داری مشاهده نشد. غلظت پلاسمایی کلسیم خون در ماهی صبیتی در شوری‌های مختلف محیطی در طی دوره آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در بررسی غلظت منیزیم پلاسما، ۲۴ساعت پس از تغییر شوری کاهش معنی‌داری در نمونه‌های مربوط به شوری ۲۰ و ۵ گرم در لیتر در مقایسه با نمونه‌های کنترل مشاهده شد. نتایج نشان داد هم در سازش با شوری۵ و هم برای سازش با شوری ۶۰ گرم درلیتر، افزایش کورتیزول نقش مهمی در ابتدای مواجهه با شوری‌های جدید داشته است، به گونه‌ای که میزان آن طی ۱۲ ساعت نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش معنی‌داری داشته است، اما پس از آن و به تدریج با ایجاد سایر تغییرات در بافت‌ها و سلول‌های مؤثر در تنظیم اسمزی، مقادیر کورتیزول به سطوح پایه بازگشت.

واژه‌های کلیدی: تنظیم اسمزی، کورتیزول، گلوکز، الکترولیت‌ها، اکوفیزیولوژی.

* نویسندهٔ مسئول: عبدالعلی موحدی‌نیا
E-mail: amovahedinia@yahoo.com

Changing in Plasma Factors in Sobaity, *Sparidentex hasta* in Different Environmental Salinities

A. Mir-Aali[1], A. A. Movahedi-nia[2]*, R. Abdi[3], M. P. Salati[4]
1, 2, 3, M. Sc. Student and Assistant Professors, Department of Marine Biolog, Khoramshahr University of Marine Science and Technology
4. Assistant Professor, Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, Khoramshahr University of Marine Science and Technology
(Received: Oct. 28, 2013; Accepted: Sep. 18, 2014)

Abstract
144 juvenile Sobaity, *Sparidentex hasta*, after acclimation to laboratory conditions in sea water (40ppt) for one week, sea water was replaced with different salinities (5, 20 and 60ppt) and seawater (40ppt) as control. Samplings were performed at 6 and 12 hours, 1, 2, 7 and 14 days after the time of changing in environmental salinities. Blood samples were collected for plasma cortisol, glucose and electrolytes analysis. According to the results, plasma levels of cortisol showed significant increases in 5 and 60 ppt environment in relation to control and 20ppt groups 12 hours from the beginning of the experiment. However in 24h samples up to the end of the experiment (14days) there were no significant differences among treatments. Plasma glucose levels showed a significant increase only at 12h sampling time in relation to 6 and 24hours in fish adapted to 5 and 60ppt. Plasma Ca^{++} concentrations had no significant changes during experiment. Plasma Mg^{++} amounts decreased significantly in 5 and 20 ppt groups in relation with control at 24 h sampling time. In conclusion, cortisol has important role in adaptation to both 5 and 60ppt at the beginning of the exposure, because of its significant increase at just 12 hours in 5 and 60 ppt than the controls, but the role of cortisol has been replaced with other changes in osmoregulatory related tissues and cells according to the plasma cortisol amounts in 5 and 60ppt that returned to the basic levels.

Keywords: Osmoregulation, Cortisol, Glucose, Electrolytes, Ecophysiology.

مقدمه

شوری یکی از مهمترین فاکتورهایی است که موجودات آبزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، موجودات خشکی‌زی و آبزی فشار اسمزی سلول‌هایشان را بوسیله تنظیم جریان یون‌ها و آب از غشاء سلولی با صرف انرژی کنترل کرده و ثابت نگه دارند. مکانیسم‌های تنظیم اسمزی و یونی در ماهیان به طرز چشم‌گیری رشد نموده و به آنها امکان سکونت و زندگی در نواحی اکولوژیک بسیاری را (از آب‌های بسیار شور تا آب شیرین گرفته) داده است در صورت عدم وجود فعالیت تنظیم اسمزی، آبزی با از دست رفتن بسیاری از یون‌ها و مولکول‌های حیاتی و یا عکس این موضوع (ورود یون‌ها و مولکول‌های محیطی به بدن) آسیب خواهد دید. بررسی تغییر در الکترولیت‌های خون ماهی‌های یوری هالین در پاسخ به شوری به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است. توانایی سازش با شوری‌های مختلف به توانایی ماهی‌ها در تنظیم جذب و ترشح یون‌ها و حفظ موازنه آب و مواد معدنی وابسته است (Rodriguez *et al.*, 2002). سازش ماهی دریایی با شوری‌های کم، معمولاً وقتی زمان کافی وجود داشته باشد، منجر به تفاوت‌های کم بین سطوح فاکتورهای پلاسمایی قبل و بعد از انتقال می‌شود (Woo and Chung, 1995). کورتیزول، عمده‌ترین کورتیکواستروئیدی است که از غده بین کلیوی به داخل جریان خون ماهیان استخوانی آب شیرین و دریا آزاد می‌شود. کورتیزول یکی از مهمترین هورمون‌ها در تنظیم اسمزی ماهیان است و اثر مثبتی بر تنظیم اسمزی در آب دریا دارد و در تنظیم اسمزی در آب‌های شیرین کم یون نیز مؤثر است (McCormick, 2001). تغییرات گلوکز از جمله اولین سطوح پاسخ بدن ماهی به شرایط محیطی هستند. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اهمیت و نقش کورتیزول به عنوان یک هورمون مهم در پاسخ به استرس و همچنین سازش با شوری‌های مختلف و تغییرات سطوح الکترولیت‌های پلاسما و گلوکز به عنوان متابولیت مهم در تنظیم اسمزی بود.

مواد و روش‌ها

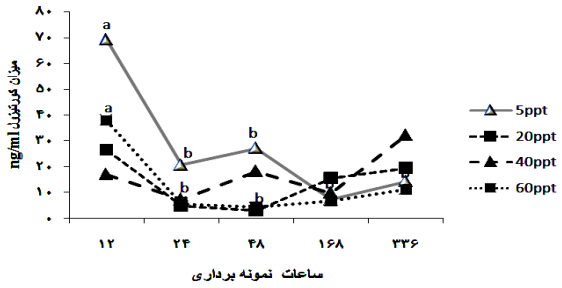
تعداد ۱۴۴ عدد ماهی صبیتی به مدت یک هفته در تانک‌های محتوی آب دریا با شوری ۴۰ گرم در لیتر به منظور تطابق با شرایط جدید انتقال داده شدند. پس از دوره سازگاری، ماهی‌ها به تانک های حاوی شوری‌های مختلف انتقال یافتند. شوری‌های مورد آزمایش ۵، ۲۰ و ۶۰ به همراه کنترل (۴۰) گرم در لیتر بودند و برای هر شوری سه تانک تکرار در نظر گرفته شد. علت استفاده از شوری ۶۰ و ۵ گرم در لیتر به این بود که در خیلی از زمان‌ها این موجود در مناطق ساحلی زندگی می‌کند در اثر بارندگی شدید و تبخیر زیاد شوری این مناطق دستخوش تغییرات شدیدی می‌شوند که بر موجودات این مناطق تأثیر زیادی می‌گذارد. برای تهیه شوری‌های مورد نظر از نمک دریا استفاده می‌کنیم به این صورت که برای تهیه شوری‌های پایین‌تر از آب دریا (۵ و ۲۰ گرم در لیتر) به آب دریا آب شیرین اضافه می‌کنیم تا زمانی که شوری به مقدار مورد نظر برسد و برای تهیه شوری ۶۰ گرم در لیتر به آب دریا نمک دریا را اضافه می‌کنیم. نمونه‌برداری از ماهیان در۶ مرحله در ساعت ۶، ساعت ۱۲، روز ۱، روز ۲، روز ۷ و روز ۱۴ (به صورت همزمان و ۱ ماهی از هر تانک ۳ماهی از هر تیمار) انجام شد. ماهیان از طریق روش حمام و به وسیله گل میخک بی‌هوش شدند. پس از این مرحله با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی از ماهی ۱ میلی‌لیتر نمونه خون تهیه شد. نمونه‌های خونی به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور rpm ۶۰۰۰ قرارگرفته و پلاسمای آن برای سنجش برداشت شد. نمونه‌ها تا زمان سنجش در فریزر۸۰- نگهداری شدند. سنجش غلظت کورتیزول (ng/ml) به روش رادیو ایمنواسی (RIA) با استفاده از کیت تجاری ImmunoTech (^{125}I RIA kit)، فرانسه) انجام شد. برای اندازه‌گیری

غلظت کلسیم، منیزیم و گلوکز (mg/100ml) پلاسما از روش رنگ‌سنجی[1] با استفاده با دستگاه Technicon RA 1000 Analyzer و کیت تجاری مخصوص هر کدام (MAN) صورت گرفت (Kelly et al.,1999; Moron *et al.*, 2003). روش رنگ‌سنجی برای اندازه‌گیری فاکتورهای مربوطه بر اساس ایجاد رنگ در مجاورت معرف مربوطه می‌باشد دستگاه آنالایزر Technicon RA1000 به طور اتوماتیک حدود ۲۰۰µl نمونه (پلاسما) را کشیده و با همین یک بار برداشت نمونه، تمام سنجش‌ها را انجام می‌دهد. جهت مقایسه میانگین غلظت‌های گلوکز و کورتیزول پلاسما در شوری‌های مختلف در زمان‌های متفاوت نمونه‌برداری از آزمون آنالیز واریانس One Way Anova استفاده و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار برای مقایسه دوبه دوی داده‌ها از پس آزمون Tukey استفاده شد.

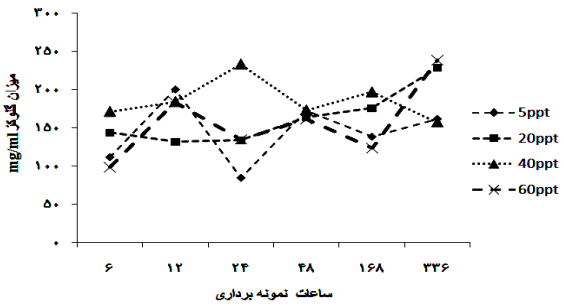
نتایج

در شوری‌های ۵ و ۶۰ گرم در لیتر ۱۲ ساعت پس از اعمال شوری‌های جدید میزان کورتیزول بیشتر از سایر زمان‌ها بود. سطوح کورتیزول پلاسما در زمان ۱۲ ساعت بین شوری‌های ۵ و ۶۰ گرم در لیتر افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های کنترل و شوری۲۰ گرم در لیتر داشت (P<۰/۰۵)، اما بعد از آن در زمان ۲۴ساعت تا پایان دوره نمونه‌برداری بین شوری‌های مختلف اختلافی مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۱).

بررسی تغییرات غلظت گلوکز در طی سازگاری شوری‌های مختلف نشان داد میزان این متابولیت نمونه‌های سازش داده شده با شوری‌های ۵ و ۶۰ گرم در لیتر در ساعت ۱۲ افزایش معنی‌داری نسبت به ساعت ۶ و ۲۴ نشان داد (P<۰/۰۵) اما مقدار آن در طول دوره آزمایش در سایر شوری‌های مورد بررسی تغییرات معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). در ۲۴ ساعت اول دوره آزمایش بین شوری ۵ و ۴۰ گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری در میزان گلوکز پلاسما مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۲).

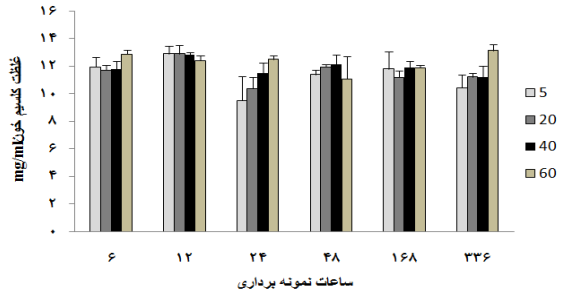


شکل۱. بررسی تغییرات غلظت کورتیزول پلاسما طی سازش با شوری‌های مختلف



شکل۲. بررسی غلظت گلوکز خون ماهی صبیتی طی سازش با شوری‌های مختلف

در بررسی حاضر غلظت پلاسمایی کلسیم خون در ماهی صبیتی در شوری‌های مختلف محیطی دوره آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳).



شکل۳. بررسی غلظت کلسیم پلاسما ماهی صبیتی طی سازش با شوری‌های مختلف

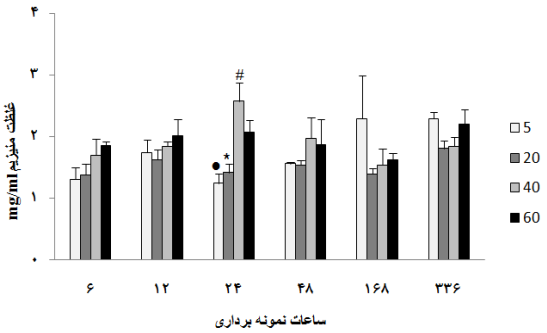
1. Colorimetry

در بررسی غلظت منیزیم پلاسما ۲۴ ساعت پس از تغییر شوری کاهش معنی‌داری در نمونه‌های مربوط به شوری ۲۰ و ۵ گرم در لیتر در مقایسه با نمونه‌های کنترل مشاهده شد (شکل۴).

بحث و نتیجه‌گیری

در ماهیان افزایش میزان کورتیزول پلاسما به طور معمولی به عنوان یک نشانگر اولیه در پاسخ به استرس استفاده می‌شود (Giari et al., 2006). Franklin و همکاران (1992) روند سازگاری ماهی آزاد sockeye را با آب شور مطالعه کردند. نتایج حاکی از افزایش زیاد و سریع کورتیزول در این ماهی می‌باشد، باید اشاره کرد که این افزایش دوباره پس از زمان کوتاهی (۲۴ ساعت) به میزان عادی برگشت. Movahedinia و همکاران (2009) با بررسی پاسخ کورتیزول به شوری‌های مختلف در ماهی شانک زرد باله، نشان داد سطوح هورمون کورتیزول سریعاً پس از انتقال به شوری بالاتر از آب دریا (۶۰ گرم در لیتر) افزایش یافت، بطوریکه غلظت آن در خون ماهیان، ۱۲ ساعت پس از انتقال به آب دریای غلیظ‌شده (۶۰ گرم در لیتر)، تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های تیمار کنترل داشت. همچنین این مقدار در مقایسه با نمونه‌های شوری ۲۰ گرم در لیتر افزایش معنی‌داری داشت. این سطوح افزایش یافته تا روز سوم پس از انتقال همچنان وجود داشت. اما مقادیر آن از روز هفتم به سطوح عادی بازگشت. افزایش کوتیزول بلافاصله پس از ورود به آب شور می تواند پاسخی به استرس تغییر سریع شوری باشد، هورمون گلیکوکورتیکوئیدی کورتیزول به عنوان مینرالوکورتیکوئید و نیز محرک ذخیره انرژی بیشترین تاثیر مستقیم را در تنظیم فیزیولوژیک در شرایط جدید اسموتیک محیطی برای ماهیان دارد. از طرفی انتقال سریع از آب شیرین به آب شور و بر عکس، به عنوان عامل استرس‌زای مؤثر توانایی برانگیختن پاسخ به استرس را دارد. Barton و همکاران (2002) نشان دادند که پاسخ‌های فیزیولوژیکی استرس وابسته به شدت و میزان عوامل استرس زا دارد و هورمون کورتیزول و متابولیت‌های شاخص در تنش‌های محیطی از جمله گلوکز اولین سطوح پاسخ بدن ماهی به شرایط محیطی هستند. تغییرات سطوح متابولیت‌های خون ناشی از شوری نیز در تعدادی از گونه‌های دریایی به خوبی بررسی شده است (Mancera et al., 1993; Munro et al., 1994; Woo and Chung., 1995; Kelly et al., 1999). تغییر سطح متابولیت‌های خون در پاسخ به تغییرات شوری می‌تواند بازتابی از دست دادن هومئوستاز باشد یا یک پاسخ جبرانی را نشان دهد (Schreck, 1990). Laiz-Carrion و همکاران (2005) در بررسی سطوح گلوکز در شوری‌های مختلف بر روی ماهی شانک gilthead تغییر معنی‌داری مشاهده نکرد. در بررسی تغییرات سطح گلوکز در ماهی کپور معمولی در طی سازگاری با شوری‌های مختلف یک روند افزایشی نشان داد به این معنی که در پاسخ به تغییرات شوری مقدار گلوکز پلاسما افزایش معنی‌داری یافته و بیشترین مقادیر در شوری ۱۲ گرم در لیتر مشاهده گردید (Salati et al., 2010). یکی از علت‌های افزایش گلوکز را تاثیرگذاری مستقیم هورمون کورتیزول برای راه اندازی و تسریع گلیکولیز در بافت کبد و آزادسازی گلوکز به خون برای مقابله با عامل استرس زا دانست (Munro et al., 1994). عدم تغییر در غلظت کلسیم مشابه با نتایج توسط Hickman و Trump (1969) نیز در مطالعه ماهیان استخوانی با محاسبه مقادیر پاکسازی پلاسما و ادرار بدست آمد. ماهیان استخوانی یوری هالین سازش یافته با آب دریا و گونه‌های دریایی، ادرار با غلظت بالای کلسیم تولید می‌کنند که مقدار آن به وضوح در پلاسما بالا می‌باشد (Bijvelds et al., 1997). در بررسی انجام‌شده بر روی *Paralichthys orbignyanus* طی سازگاری با شوری‌های مختلف افزایش اندکی در

میزان پلاسما گزارش شد (Ander et al., 2002). احتمالاً دلیل کاهش مشاهده شده در میزان غلظت منیزیم، افزایش در میزان فیلتراسیون در پی ورود حجم بالا آب به بدن ماهی بوده که میزان ادرار و هم زمان ترشح توبولی منیزیم را افزایش می‌دهد و در ادامه با سازش ماهی در شوری‌های پایین‌تر ترشح توبولی منیزیم به شدت محدود می‌شود. مشاهدات حاصل از مطالعه روی ماهیان آب شیرین نشان می‌دهد که در این ماهیان فیلتراسیون کلیوی با سرعت بالا و بازجذب تقریباً تمام مواد محلول انجام و بنابراین حجم زیادی ادرار رقیق تولید می‌شود، لذا در این روش آبی که از طریق اسمزی وارد بدن شده است با حداقل دفع یون از بدن خارج می‌شود (Evans et al., 1999). از طرفی تغییرات هیستولوژیک که در کلیه ماهی در طول سازش اسمزی اتفاق افتاده منجر به دگرگونی بازده در ترشح ،سرعت فیلتراسیون گلومرولی و تولید ادرار در شرایط محیطی هایپراسمتیک و هایپواسمتیک شد (Beyenbach, 1995; Renfro, 1995).



شکل۴. بررسی غلظت منیزیم پلاسما ماهی صبیتی طی سازش با شوری‌های مختلف

نتایج نشان داد هم در سازش با شوری ۵ و هم برای سازش با شوری ۶۰ گرم در لیتر، افزایش کورتیزول نقش مهمی در ابتدای مواجهه با شوری‌های جدید داشته است، به گونه ای که میزان آن طی ۱۲ ساعت نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش معنی‌داری داشته است، اما پس از آن و به تدریج با ایجاد سایر تغییرات در بافت‌ها و سلول‌های مؤثر در تنظیم اسمزی، مقادیر کورتیزول به سطوح پایه بازگشت.

REFERENCES

Barton BA (2002) Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integ Comp Biol; 42: 517-525.

Beyenbach KW (1995) Secretory electrolyte transport in renal proximal tubules of fish. In: Wood CM, Shuttlewoth TJ (editors) Fish physiology, ionoregulation: cellular and molecular approaches. 3rd Ed, New York: Academic Press; 85-106.

Bijvelds MJC, Kolar Z, Wenderlaar Bonga SE (1997) Mineral balance in *Oreochromis mossambicus*: Dependence on magnesium in diet and water. Fish Physiol Biochem; 16: 323-331.

Evans DH, Piermarini PM, Potts WTW (1999) Ionic transport in the fish gill epithelium. Exp Zool; 283: 641–652.

Franklin CE, Forster ME, Davison W (1992) Plasma cortisol and osmoregulatory changes in sockeye salmon Transferred to seawater :comparison between successful and unsuccessful adaptation. J. Fish Biol, 41:113-122.

Giari L, Manera M, Simoni E, Dezfuli BS (2006) Changes to chloride and rodletcellsin gills, kidney and intestine of Dicen (*trarchus labrax*) exposed to reduced salinities. J. Fish Biol, 69: 590–600

Hickman CP, Trump BF (1969) The Kidney. In: Hoar WS, Randall DJ (editors). Fish Physiology. New York: Academic Press, 91-239.

Kelly SP, Chow INK, Woo NYS (1999)

Haloplasticity of black seabream (Mylio macrocephalus) hypersaline to freshwater acclimation. Exp Zoo1, 283: 226–241.

Laiz-Carrion R, MartinDelRio MP, Miguez JM, Mancera JM, Soengas JL (2003) Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream (*Sparus aurata*). J Exp Zool; 298:105-118.

Mancera JM, Perez-Figares JM, Fernandez-Llebrez P (1993) Osmoregulatory respons estoabrupt salinity Changes in three uryhaline gilthead seabream (Sparus aurata). Comp Biochem Physiol; 106:245–250.

McCormick SD (2001) Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. Am Zool; 41: 781–794.

Moron SE, Oba ET, Andrade CA, Fernandes MN (2003) Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids Hoplias malabaricus and Hoplerythrinus unitaeniatus. Exp Zool; 298: 93-104.

Movahedinia AA, Savari A, Morovvati H, Koochanin P, Marammazi JG, Nafisi M (2009) The Effects of Changes in Salinity on Gill Mitochondria-Rich Cells of Juvenile Yellowfin Seabream, *Acanthopagrus latus*. J Biol Sci; 9: 710-720.

Munro J, Audet C, Besner M, Dutil JD (1994) Physiological Response of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) Exposed to low salinity. Can J Fish Aquat Sci; 51:2448–2456.

Renfro JL (1995) Solute transport by flounder renal cells in primary culture. In: Wood, CM and Shuttlewoth, T.J. (Eds.), Fish physiology, ionoregulation: cellular and molecular approaches. (2nd Ed.), New York, Academic Press. PP: 147-173.

Rodriguez A, Gallardo MA, Gisbert E, Santilari S, Ibarz A, Sanchez J, Castello- Sampaio LA, Bianchini A (2002) Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder (*Paralichthys orbignyanus*). J Exp Mar Biol Ecol; 269:187-196.

Salati AP, Baghbanzadeh A, Soltani M, Peyghan R, Riazi GH (2010) The response of plasma glucose, lactate, protein and hematologic parameters to osmotic challenge in common carp (*Cyprinus carpio*). Ital J Zool; 4: 49-52

Schreck CB (1990) Physiological, behavioral and performance indicators of stress. In: Adams SM (editor) Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Symposium, Maryland, 29–37.

Woo NYS, Chung KC (1995) Tolerance of *Pomacanthus imperator* to hypoosmotic salinities: changes in Body composition and hepatic enzyme activity. J. Fish Biol., 47:70-80.