مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۲، ۱۱۷-۱۰۹

تغییر تعداد یاخته‌های کلراید در تیغه ثانویه و رشته‌های آبششی ماهی زروک پرورشی (*Scatophagus argus* L.) در شوری‌های مختلف

حسن مروتی[1*] حسین ذوالقرنین[2] محمد حسین نوری موگهی[3] رحیم عبدی[2] امیر قاضی لو[4]

۱) گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.
۲) گروه زیست شناسی دریا دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر - ایران.
۳) گروه علوم پایه دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران - ایران.
۴) دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر - ایران.

(دریافت مقاله: ۳ مهر ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۲۴ آذر ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: ماهیان یوری هالین ساکن مصب همانند ماهی زروک (*Scatophagus argus* L.) در محیط طبیعی زندگی، به طور پیوسته با تغییرات شوری مواجه می‌باشند. **هدف:** مطالعه ی حاضر به منظور ارزیابی ظرفیت تنظیم اسمزی در گونه‌ی بومی از ماهیان یوری هالین در شوری‌های مختلف انجام گرفت. **روش کار:** برای این منظور انتقال مستقیم ماهی زروک از آب شیرین به آب شور با شوری‌های معین (۳۰g/L، ۲۰g/L، ۱۰g/L و ۵g/L)، در طول یک دوره ی آزمایش سی روزه انجام وسپس مراحل روتین تهیه لام بافت شناسی بر روی آبشش‌ها صورت گرفت. **نتایج:** انتقال مستقیم ماهیان از آب شیرین به شوری‌های معین، با افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد کل سلول‌های کلراید موجود در فضای بین تیغه‌ای و تلفات قابل ملاحظه‌ای در شوری‌های بالاتر همراه گردید. از طرفی نتایج حاصل از آنالیز الگوی تغییر تعداد سلول‌های کلراید، حاکی از کاهش تعداد سلول‌های کلراید در موضع تیغه‌ای و افزایش بالقوه تعداد این سلول‌ها در موضع رشته‌ای بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به نتایج بدست‌آمده از مطالعه اخیر ماهی زروک به عنوان یک مدل مناسب جهت بررسی روند تنظیم اسمزی در ماهیان آب شیرین پیشنهاد نمی‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تنظیم اسمزی، ماهی زروک، یوری هالین، مصب.

مقدمه

سلول‌های بدن ماهیان برای زنده ماندن به یک محیط با غلظت‌های خاص از مواد معین (از جمله یون‌های محلول در آب) نیاز دارند (۱). لذا، محیط داخلی بدن ماهیان همواره باید دارای مجموعه‌ای از غلظت‌های معین نمک‌های یونیزه مورد نیاز و ترکیبات آلی محلول در آب باشد(۶،۷). این درحالی است محیط خارجی، دارای مجموعه متفاوتی از این عوامل می‌باشد. بنابراین لزوم تکامل استراتژی‌های خاص تنظیم اسمزی در ماهیان امری اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد. کلیه، پوست و آبشش به عنوان سه ارگان عمده‌ی موثر در تنظیم اسمزی ماهیان استخوانی می‌توانند نقش عمده‌ای را در تنظیم اسمزی مایعات درون بدن ماهیان استخوانی در سطحی متفاوت از محیط خارجی ایفا نمایند (۸). سلول‌های کلراید موجود در بافت پوششی آبششی ماهیان استخونی به عنوان واحدهای اصلی تنظیمی یون‌های تک ظرفیتی به شمار می‌آیند. تغییرات کلی ایجاد شده در سلول‌های کلراید را برای سازش با آب شیرین یا شور در سه گروه اصلی، افزایش یا کاهش تعداد یا اندازه سلول کلراید، افزایش یا کاهش فعالیت Na^+/k^+-ATPase و ایجاد یا تخریب اتصالات بین سلول‌های کلراید وسلول‌های جانبی طبقه بندی نمود (۱۱). مطالعاتی گوناگون ودر ماهیان متفاوت در این زمینه در داخل و خارج از کشور انجام گرفت. از جمله مطالعات در سال‌های اخیر که در خارج از کشور بر روی مکانیسم تنظیم اسمزی و سلول‌های کلراید انجام گرفت به مطلعه میزان بقاء در ماهی باراکودای نابالغ (*Centropomus parallelus*) پس از انتقال مستقیم به آب شور که توسط سایر محققین انجام گرفت اشاره نمود (۲۲). همچنین در مطالعه‌ای دیگر رژیم غذایی پر نمک را به عنوان عاملی محرک در تبدیل سلول‌های کلراید از نوع آب شیرین به آب شور گزارش گردید (۲۰). بنابراین از آنجائیکه این گونه از نظر ارزش شیلاتی توجیه پذیر بوده و در محیط طبیعی خود به طور پیوسته با تغییرات آنی شوری مواجه می‌باشد، لذا از این گونه ماهیان میتوان به عنوان مدلی مناسب جهت مطالعه مکانیسم‌های دخیل در تنظیم اسمزی در ماهیان استخوانی استفاده نمود (۱،۱۴). هدف از مطالعه حاضر ارزیابی توانایی تنظیم هیپر اسموتیک ماهی زروک و مطالعه روند تغییر تعداد سلول‌های کلراید بافت پوششی آبششی این گونه در طول دوره ی سازگاری بوده است.

مواد وروش کار

طرح آزمایش: تعداد ۲۰۰ عدد ماهی زروک (*Scatophagus argus*) نابالغ و سازگار شده به آب شیرین به مدت یک ماه با طول استاندارد متوسط، ۰/۱۲±۱۱/۳۳cm (میانگین± خطای استاندارد) و وزن متوسط، ۱/۳±۷۴/۸۸g (میانگین± خطای استاندارد) در تاریخ ۸۶/۴/۱۵ از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی مروارید جنوب (وابسته به بخش خصوصی -

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۳۰۰۷۳ نمابر: ۰۶۱۱-۳۳۳۲۰۴۴ Email: hmorovvati@scu.ac.ir

بوشهر، ایران) تهیه و به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شد.

ماهیان مورد مطالعه پس از انتقال به منظور سازگاری با آب شرب شهر اهواز (به عنوان منبع آب شیرین)، به مدت ۴۸ ساعت در داخل مخازن ۲۰۰L حاوی آب شرب کلر زدایی شده شهر اهواز در دمای ۲۶-۲۴ و pH، ۷/۵-۷ قرار گرفتند. در طول مدت سازگاری، تغذیه ماهیان با استفاده از کرم خون منجمد شده (ماهیران، ایران) در دو نوبت و بامقادیر برابر با ۴٪ وزن بیوماس موجود انجام گرفت. برای انجام عملیات این تحقیق از تعداد پنج عدد اکواریوم شیشه‌ای دویست لیتری به ابعاد ۴۰cm × ۶۰ × ۱۰۰ با ارتفاع آب ۴۰cm در کنار یکدیگر و در محیط آزمایشگاه استفاده شد. برای تامین منبع آب شور مورد نیاز با شوری‌های معین ابتدا مقادیر مکفی از نمک تبخیری آب دریا جهت رطوبت گیری و و ضد عفونی به مدت نیم ساعت در دستگاه اون (دمای $60^{o}C$) قرار گرفت. سپس شوری‌های مورد نظر از طریق انحلال مستقیم مقادیر معین نمک در هر لیتر آب شرب کلر زدایی شده شهر اهواز استحصال گردید. در طول مدت مطالعه تثبیت شرایط فیزیکو شیمیایی آب از قبیل میزان آمونیاک، نیتریت، نیترات و pHمد نظر قرار داشته و با تعویض روزانه ۲۰٪ حجم آب تا باقیمانده مواد غذایی و پسماندها برای جلوگیری از ایجاد بیماری بویژه باکتریایی از آکواریوم‌ها تسهیل می‌گردید.

بعد از انجام عملیات سورت بندی، ماهیان با انجام عملیات همدمایی در دسته‌های ۳۰ تایی به آکواریوم‌های تیمارهای آب شور (۲۰g/L، ۳۰g/L، ۵g/L، ۱۰g/L) که بدلیل امکانات موجود بدون تکرار انجام گرفت و آکواریوم آب شیرین به عنوان تیمار شاهد انتقال یافته، و به مدت ۳۰ روز در تیمارهای شوری و تیمار شاهد نگهداری شدند. همچنین شوری‌های انتخاب شده در مطالعه فوق بخاطر بررسی روند تنظیم اسمزی در گونه مورد نظر در وزن و سن خاص بوده و بالطبع شوری‌های دیگر در همین گونه با شریط فوق ویا با وزن و سنهای مختلف در مطالعات تحقیقی دیگر قابل بررسی می‌باشد. در طول مدت مطالعه تغذیه ماهیان با استفاده از کرم خون منجمد شده (ماهیران، ایران) انجام گرفت . در طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکو شیمیایی آب از قبیل شوری، دما، pH و با استفاده از رفرکتومتر نوری (Horiba U-10، ژاپن) و بدون خطا، ترمومتر دیجیتالی (Horiba U-10، ژاپن) و pHمتر دیجیتالی (Horiba U-10، ژاپن) انجام گرفته و در طول آزمایش مقدار اکسیژن محلول حدود ۲mg/L در دمای ۲۶-۲۴ و pH، ۷/۵-۷ قرار گرفته و آکواریوم‌ها مجهز به سیستم هوادهی مداوم بودند.

نمونه برداری: نموه برداری از ماهیان مورد آزمایش درتیمارهای مختلف قبل از آغاز آزمایش و درسه بازه ی کوتاه مدت، میان مدت و بلند مدت پس از انتقال انجام گرفت. بدین ترتیب ،در فاصله زمانی ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، ۱۰روز، ۱۵روز، و ۳۰روز پس از انتقال ماهیان به تیماهای آب شور، پس از ثبت میزان تلفات، تعداد ۴عدد ماهی، به تصادف از هر تیمار آب شور و تیمار آب شاهد انتخاب و بلافاصله در داخل وان فایبر گلاس حاوی ۲۰L محلول ۱۰۰ppm ماده بیهوشی عصاره ی میخک (رازی، ایران) تهیه شده با آب شیرین و به مدت یک دقیقه در معرض قرار گرفتند. پس از ایجاد بیهوشی کامل (توقف کامل حرکت سرپوشهای آبششی طرفین سر) و انجام بیومتری (ثبت مقادیر طول کل، طول استاندارد و وزن کل) کمان آبششی دوم به طور کامل از نیمه آبششی سمت چپ ماهی جدا گردید وپس از تثبیت در محلول بوئن و تهیه مقاطع ۵μm با استفاده از میکروتوم دیجیتالی بر اساس روش رنگ آمیزی معمول در آزمایشگاه بافت شناسی یعنی هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) رنگ آمیزی شدند که در این روش هسته رنگ بازوفیلی و سیتوپلاسم رنگ ائوزینوفیلی به خود می‌گیرند. پس از اتمام مراحل رنگ آمیزی مجموع تعدادسلول‌های کلراید موجود در فضای بین تیغه‌ای و تیغه‌ای - رشته‌ای (در چندین مقطع از هر نمونه بافت آبشش)، توسط میکروسکوپ نوری Olympus BH-2 در بزرگنمایی ۱۰۰ عدسی شیئی و در چندین میدان میکروسکوپی شمارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: کلیه آنالیزهای آماری اطلاعات مربوط به تعداد سلول‌های کلراید به شرح ذیل توسط نرم افزار SPSS 13 و Minitab 14.2 انجام گرفت. بدین ترتیب آنالیزسطح پاسخ (Response surface analysis) برای شبیه سازی نرخ تلفات پس از انتقال مستقیم ماهیان تحت مطالعه از آب شیرین به آب شور و تخمین اپتیمم بازه ی تغییرات آنی شوری وآزمون آنالیز واریانس ANOVA و پس آزمون bonfferoni برای بررسی تاثیر شوری و زمان روی تغییر تعداد سلول های کلراید و برای مقایسه تاثیر شوری و زمان در تغییر تعداد سلول های کلراید و میزان بقاء استفاده شد مقایسه ی نرخ تغییر تعداد سلول‌های کلراید در مواضع، شوری‌ها و زمان‌های مختلف نیز با تعیین معادله ی گرایش خطی این تغییرات میسر گردید. احتمال جابجایی سلول‌های کلراید در دو موضع متفاوت با بکار گیری ازمون همبستگی بررسی گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز میزان بقاء ماهیان در پروسه ی سازگاری: در طول مدت سازگاری ۳۰ روزه هیچ گونه تلفاتی در ماهیان شاهد و ماهیان انتقال یافته به شوری ۵g/L مشاهده نگردید ولیکن در دو شوری ۲۰g/L ول. ۳۰g/L، میزان تلفات به ترتیب در روز هجدهم و بیست و پنجم بعد از آغاز آزمایش به ۱۰۰٪ رسید. توزیع تراکمی میزان تلفات در طول دوره سازگاری، روند یکسانی را در شوری های مختلف طی نکرد (تصویر ۱).

با رسم نمودار نمای کرانی میزان بقاء با استفاده از آنالیزسطح پاسخ (Response surface analysis)، در طول دوره سی روزه آزمایش، مقادیر شوری تا ۱۵ g/L به عنوان بازه ی اطمینان تحمل شوری برآورد گردید. همچنین در شوری‌های بالاتر ارتباط مستقیم بین شدت شوری و میزان تلفات کاملا مشهود بوده است. (تصویر ۲).

نتایج حاصل ازمقایسه تعداد سلول‌های کلراید در طول دوره تحمل سی

جدول ۱ـ میزان گرایش خطی تغییر تعداد کل سلول‌ها کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای به فاکتور زمان در شوری‌های مختلف (در طول ۱۰ روز اول دوره‌ی سازگاری).

شوری (g/L)	موضع	R-Square	Significance	معادله رگرسیونی
۰	تیغه	۰/۰۰	۰/۹۹	(تعداد روز) ۰/۰۰۰۰۱ - ۰/۸۱ = تعداد سلول
	رشته	۰/۰۰	۰/۹۲	(تعداد روز) ۰/۰۰۰۱۷ + ۲/۶۹ = تعداد سلول
۵	تیغه	۰/۲۰	۰/۰۰	(تعداد روز) ۰/۰۲۹ - ۰/۵۸ = تعداد سلول
	رشته	۰/۶۱	۰/۰۰	(تعداد روز) ۰/۱۵ + ۲/۹۹ = تعداد سلول
۱۰	تیغه	۰/۲۵	۰/۰۰	(تعداد روز) ۰/۰۳۸ - ۰/۵۲ = تعداد سلول
	رشته	۰/۶۹	۰/۰۰	(تعداد روز) ۰/۱۸ + ۲/۹۲ = تعداد سلول
۲۰	تیغه	۰/۲۷	۰/۰۰	(تعداد روز) ۰/۰۳۶ - ۰/۵۰ = تعداد سلول
	رشته	۰/۶۴	۰/۰۰	(تعداد روز) ۰/۲۲ + ۳/۳۱ = تعداد سلول
۳۰	تیغه	۰/۲۱	۰/۰۰	(تعداد روز) ۰/۳۷ - ۰/۴۵ = تعداد سلول
	رشته	۰/۶۳	۰/۰۰	(تعداد روز) ۰/۲۱ + ۳/۲۴ = تعداد سلول

جدول ۲ـ میزان همبستگی بین تعداد سلول‌ها در دو موضع رشته‌ای و تیغه‌ای در دوره‌ی ۱۰ روزه از پروسه‌ی سازگاری با شوری‌های تحت آزمون.

شوری	موضع	تیغه	
۰	رشته	-۰/۰۰۱۹۰/۹۳	Pearson's r Significance
۵	رشته	-۰/۵۲۰/۰۰۷	Pearson's r Significance
۱۰	رشته	-۰/۵۷۰/۰۰۴	Pearson's r Significance
۲۰	رشته	-۰/۷۳۰/۰۰	Pearson's r Significance
۳۰	رشته	-۰/۶۶۰/۰۰	Pearson's r Significance

روزه: نتایج حاصل از مقایسه تعداد سلول‌های کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای در طول پروسه‌ی سازگاری با استفاده از آنالیز واریانس حاکی از تفاوت معنی‌دار در تعداد این سلول‌ها در دوره‌های مختلف از پروسه‌ی سازگاری بود (تصویر ۳).

از طرفی بررسی گرایش خطی تغییرات تعداد سلول‌ها به فاکتور زمان در شوری‌های مورد استفاده حاکی از وجود ارتباط مستقیم بین شوری و تعداد سلول‌های کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای در طول ۱۰ روز اول دوره سازگاری بود (جدول ۱).

در جدول ۲ میزان همبستگی بین تعداد سلول‌ها در دو موضع رشته‌ای و تیغه‌ای در دوره‌ی ۱۰ روزه از پروسه‌ی سازگاری با شوری‌های تحت آزمون مشخص گردیده است.

در تصویر ۴ توزیع تعداد سلول‌های کلراید در بافت پوششی آبشش ماهی زروک پس از انتقال به آب با شوری‌های مختلف نشان داده شده است.

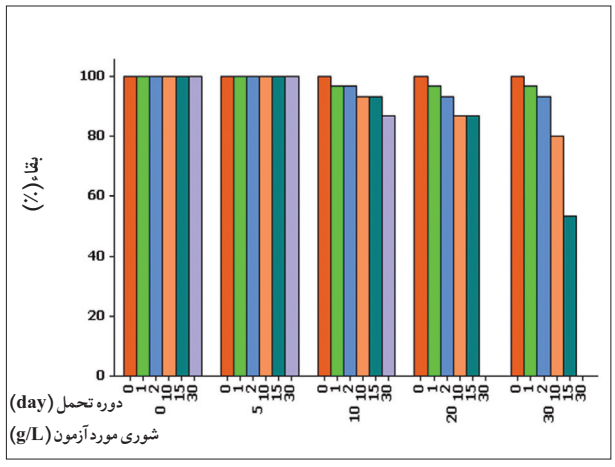
بحث

میزان بقاء: مساله تنظیم اسمزی در ماهیان یوری‌هالین به عنوان یک پروسه‌ی چند متغیره مطرح می‌گردد. لذا تنظیم اسمزی موثر در این دسته از ماهیان میتواند بازتابی از فاکتورهای درگیر باشد.

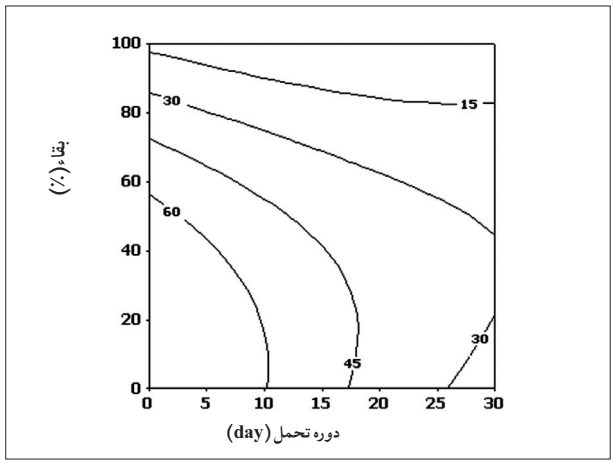
در مطالعه حاضر، پس از انتقال مستقیم ماهیان به شوری‌های ۵،۱۰،۲۰،۳۰ppt، تلفات ماهیان در شوری‌های ۱۰،۲۰،۳۰ppt، در عرض ۴۸ ساعت پس از انتقال آغاز گردید. در طول یک بازه تحمل ۳۰ روزه‌ی مواجهه با تغییرات آنی شوری، تلفات ماهی زروک در شوری ۳۰ppt با رشد تصاعدی و در شوری‌های پایین تر بصورت فرآیندی با یک الگوی نامشخص همراه گردید. میزان بقاء کل ماهیان زروک در طول این مدت، در شوری ۵ppt برابر با ۱۰۰٪، در شوری ۱۰ppt برابر با ۸۶/۶۶، در شوری ۲۰ppt برابر با ۰٪ و در شوری ۳۰ppt برابر با ۰٪ برآورد گردید. این در حالی است که پس از انتقال مستقیم ماهی یوری‌هالین باراکودای *Centropomus parallelus* در اندازه‌های مختلف به شوری‌های مشابه میزان تلفات این گونه در هیچ کدام از شوری‌ها از ۴۰٪ تجاوز نکرد(۲۲). از طرفی پرورش ماهی سوکلای *Rachycentron canadum* نابالغ ۱۰۰g در شوری ۵،۱۰،۳۰ppt به مدت ۱۰ هفته با میزان تلفات ۲۰٪ همراه بود، لیکن تفاوت معنی‌داری در میزان تلفات بین شوری‌های مختلف مشاهده نگردید (۵). با این حال پرورش یک ماهه‌ی ماهی گامبوزیای *Gambusia affinis* بالغ پس از انتقال مستقیم به شوری‌های مشابه تنها با میزان تلفات ۲۰٪ مواجه گردید(۳). همچنین با بررسی میزان بقاء گونه‌های مختلف آزاد ماهیان پس از انتقال مستقیم به شوری‌های مختلف ۳ دلیل عمده را در میزان بقاء این دسته از ماهیان موثر دانستند. در وهله اول اندازه ماهی می‌تواند با تغییر میزان نسبت سطح به حجم ماهی، در تغییر میزان فشار اسمزی موثر باشد. در ماهیان بزرگتر با کاهش نسبت سطح به حجم ماهی ،سطوح در معرض اختلاف فشار اسمزی به حداقل خواهد رسید. در وهله‌ی بعد افزایش سن ماهی احتمالاً با افزایش ضخامت پوست و آبشش و کاهش میزان نفوذ پذیری این اندام‌ها همراه خواهد شد. در این حالت دفع آب بدن از غشاهای نفوذپذیری همچون آبشش و پوست با شدت کمتری صورت خواهد پذیرفت. در نهایت یا افزایش سن، مکانیسم‌های دخیل در تنظیم اسمزی از قبیل افزایش تعداد سلول‌های کلراید می‌تواند تقویت

گردد(۱۹). مطالعات بعدی در زمینه ی بررسی نحوی سازگاری ماهیان ساکن نمکزاهای ساحلی با تغییرات شوری حاصل از تغیرسطح آب دریا، بیانگرنقش مستقیم پایه ژنتیکی سازگاری، درراندمان تحمل تغییرات آنی شوری حاصل از تغییرات سطح آب دریا بود. به عنوان مثال ماهیان گامبوزیای ساکن مناطق لب شور و مناطق میانی نمکزارهای ساحلی از پتانسیل بالاتری در تحمل تغییرات آنی شوری نسبت به جمعیت‌های ساکن در مناطق دارای آب شیرین برخوردار می‌باشند. در این حالت جمعیت‌های حاصل از تولید مثل ماهیان ساکن مناطق لب شور در نسل‌های بعدی نیزبقاء بیشتری را درمواجهه با تغییرات آنی شوری نسبت به انواع ساکن آب شیرین نشان خواهند داد(۱۵).

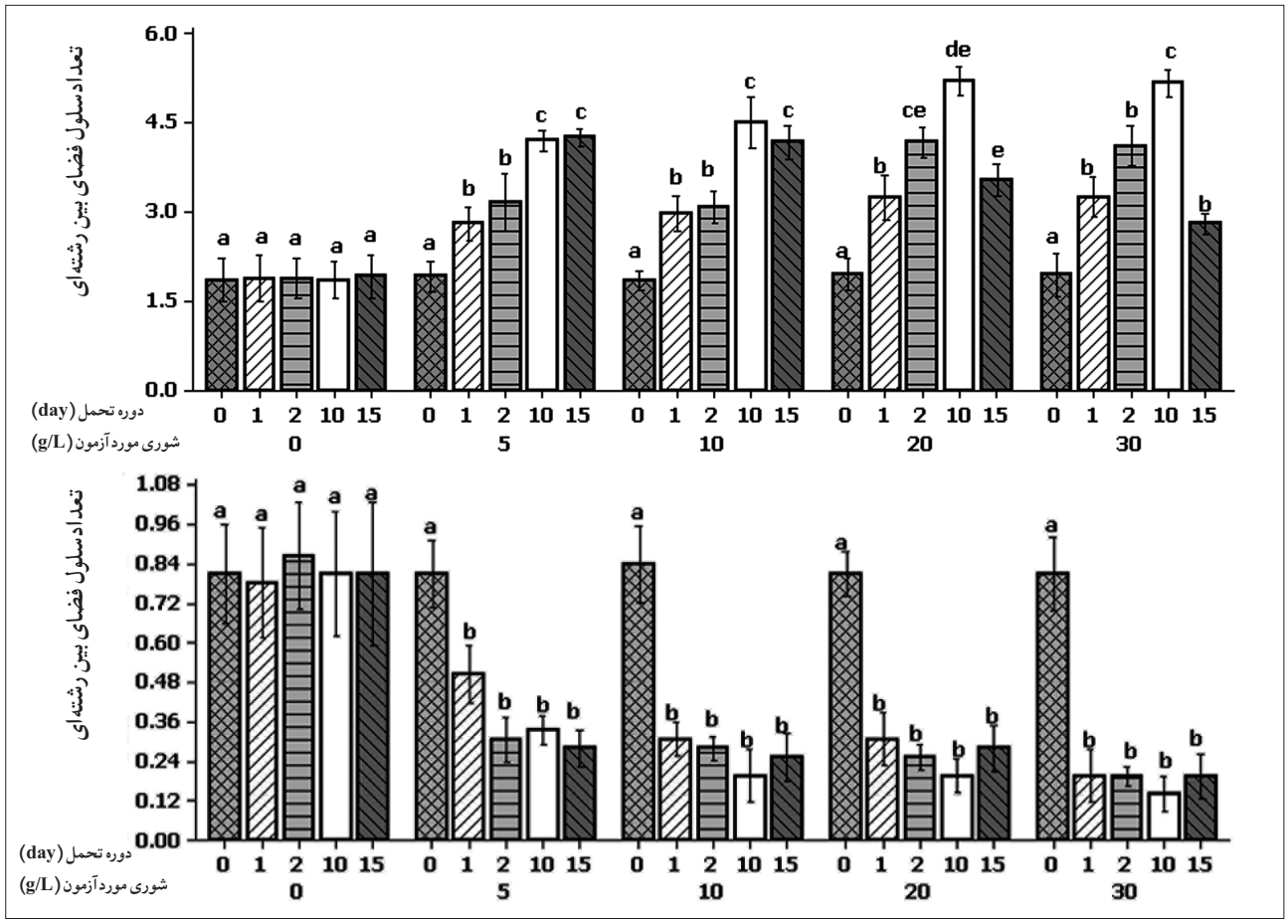
تغییر تعداد سلول‌های کلراید: در ماهیان استخوانی آبشش به عنوان ارگان اصلی دخیل در تنظیم اسمزی و حفظ تعادل هیدرومینرال در محیط‌های هیپو اسموتیک وهیپراسموتیک به شمار می‌آید. در واقع پروسه ی کلی تنظیم یونی در ماهیان استخوانی با دخالت سلول‌های سنگفرشی در جذب یون در شرایط هیپو اسمتیک و دخالت سلول‌های کلراید در دفع یون در شرایط هیپر اسموتیک همراه خواهد بود، لذا حفظ تعادل اسمزی مایعات بدن موجود در مواجهه با تغییرات اسمزی، مستلزم ایجاد تغییرات مورفومتریک و ساختاری در انوع سلول‌های دخیل در تنظیم اسمزی ماهیان استخوانی خواهد بود. در مطالعه حاضر انتقال مستقیم ماهی زروک نا بالغ، از آب شیرین به آب شور در مراحل مختلف سازگاری با تغییرات عمده در تعداد سلول‌های کلراید همراه بود. در این حالت انتقال مستقیم ماهیان از آب شیرین به شوری‌های ppt۳۰،۲۰،۱۰،۵، با افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد کل سلول‌های کلراید موجود در فضای بین تیغه‌ای مواجه گردید. در ۱۰روز اول دوره سازگاری، این تغییر تعداد با یک شیب ملایم در شوری‌های پایین تر و یک شیب مثبت قابل ملاحظه در شوری‌های بالاتر همراه گردید. در واقع شاید بتوان القاء پتانسیل سازگاری را در این گونه، در دوره‌های کوتاه مدت و میان مدت سازگاری متاثر از دو فاکتور اصلی زمان و شوری دانست. لیکن با گذشت زمان و پس از طی دوره ده روزه سازگاری، می‌توان الگوی متفاوتی را در تغییر تعداد سلول‌های کلراید انتظار داشت. بدین ترتیب در مطالعه حاضر، پس از انتقال ماهیان به شوری‌های پایین تر، در دراز مدت (روز پانزدهم و روز سی ام)، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های کلراید موجود در اپیتلیوم آبششی رویت نگردید و تمایل سلول‌های کلراید به حفظ تعادل در یک تراکم بالاتر امری مشهود به نظر می‌رسید. لیکن کاهش شدید تعداد سلول‌های کلراید در روز پانزدهم پس از انتقال به آب شور با شوری ppt ۲۰ و ppt ۳۰ و گزارش ۱۰۰٪ میزان تلفات در روز ۳۰ام دوره سازگاری در ماهیان انتقال یافته به این دو شوری می‌تواند موید عدم تکمیل پروسه ی سازگاری در دوره سی روزه پس از انتقال به شوری‌های ppt ۲۰ و ppt ۳۰ باشد. از طرفی در مطالعه حاضر، بررسی دقیقتر تغییر تعداد سلول‌های کلراید در دو موضع رشته‌ای و تیغه‌ای، حاکی از حضور یک الگوی کاملاً متفاوت در تغییر تعداد سلول‌های دو ناحیه مذکور بود. به نحویکه پس از انتقال مستقیم ماهیان زروک نا بالغ از آب شیرین به آب شور، کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های کلراید تیغه‌ای در دو روز اول دوره سازگاری امری محرز به نظر می‌رسد. لیکن شاید نتوان الگوی دقیقی برای این تغییرات آنی کوتاه مدت، براساس شدت شوری مختلف وضع نمود. لیکن آنچه مسلم است این است که، با گذشت زمان ،تکمیل پروسه‌ی سازگاری در این گونه با افزایش موضعی و بطئی تعداد سلول‌های کلراید تیغه‌ای، و ظهور سلول‌های نو ساخت در تمام شوری‌های تحت آزمون همراه بوده است. انتقال مستقیم ماهی زروک آب شیرین به آب شور نتایج متفاوتی را در تغییر تعداد سلول‌های کلراید مواضع رشته‌ای نسبت به مواضع تیغه‌ای در برداشته است. به نحویکه افزایش شدید در تعداد سلول‌های کلراید این ناحیه در طول ۱۰ روز اول دوره سازگاری در تمام شوری‌های تحت آزمون، الگوی تغییر تعداد سلول‌های کلراید را در این ناحیه، به طرحی کاملاً متفاوت با ناحیه تیغه‌ای تبدیل نموده است. با گذشت زمان و پس از طی دوره ده روزه سازگاری، می‌توان الگوی متفاوتی را در تغییر تعداد سلول‌های کلراید انتظار داشت. بدین صورت در مطالعه حاضر، پس از انتقال ماهیان به شوری‌های پایین تر، در دراز مدت (روز پانزدهم و روز سی‌ام)، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های کلراید رشته‌ای، رویت نگردید و تمایل سلول‌های کلراید به حفظ تعادل در یک تراکم بالاتر امری مشهود به نظر می‌رسید. لیکن کاهش شدید تعداد سلول‌های کلراید در روز پانزدهم پس از انتقال به آب شور، با شوری ppt ۲۰ و ppt ۳۰ و گزارش ۱۰۰٪ میزان تلفات در روز ۳۰ام دوره سازگاری در ماهیان انتقال یافته به این دو شوری می‌تواند موید عدم تکمیل پروسه ی سازگاری، در دوره سی روزه پس از انتقال به شوری‌های ppt ۲۰ و ppt ۳۰ باشد. بررسی‌های انجام شده درمورد سایر ماهیان حاکی از حضور مکانیسمی مشابه وگاهاً متفاوت در گونه‌های مختلف ماهیان یوری‌هالین بوده است. بررسی تاثیر تغییرات شوری روی تغییرات مورفولوژیک سلول‌های کلراید آبششی ماهی سرخو (Pagrus auratus) حاکی از تفاوت تعداد سلول‌های کلراید کروی و استوانه‌ای موجود در فضای بین تیغه‌ای در شوری‌های مختلف بود. به نحویکه انتقال مستقیم ماهیان از شوری ppt ۳۰ به شوری ppt ۴۵، با عدم تغییر در تعداد سلول‌های کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای همراه بود. لیکن انتقال مستقیم ماهی سرخوا ز شوری ppt ۳۰ به شوری ppt ۱۵ با کاهش تعداد سلول‌های کلراید تیغه‌ای همراه گردید. لیکن هیچ گونه تغییری در تعداد سلول‌های کلراید رشته‌ای مشاهده نشد(۹). مقایسه توزیع سلول‌های کلراید حساس به آنتی بادی Na/K-ATPase در خامه ماهی سازگار شده با آب شور، آب لب شور و آب شیرین نیز حاکی از وجود تفاوت عمده در توزیع این سلول‌های در بخش‌های مختلف اپیتلیوم آبششی بود. بدین ترتیب تراکم تعداد سلول‌های کلراید حساس به آنتی بادی Na/K-ATPase در ناحیه‌ی تیغه‌ی و قاعده‌ی تیغه در ماهیان سازگار شده با آب شیرین از بیشترین



تصویر۱ـ مقایسه میزان بقاء(٪) ماهی زروک در دوره تحمل سی روزه پس از انتقال مستقیم به شوری‌های تحت آزمون.
زمان(day) ۲۰ ۱۵ ۱۰ ۲ ۱ ۰



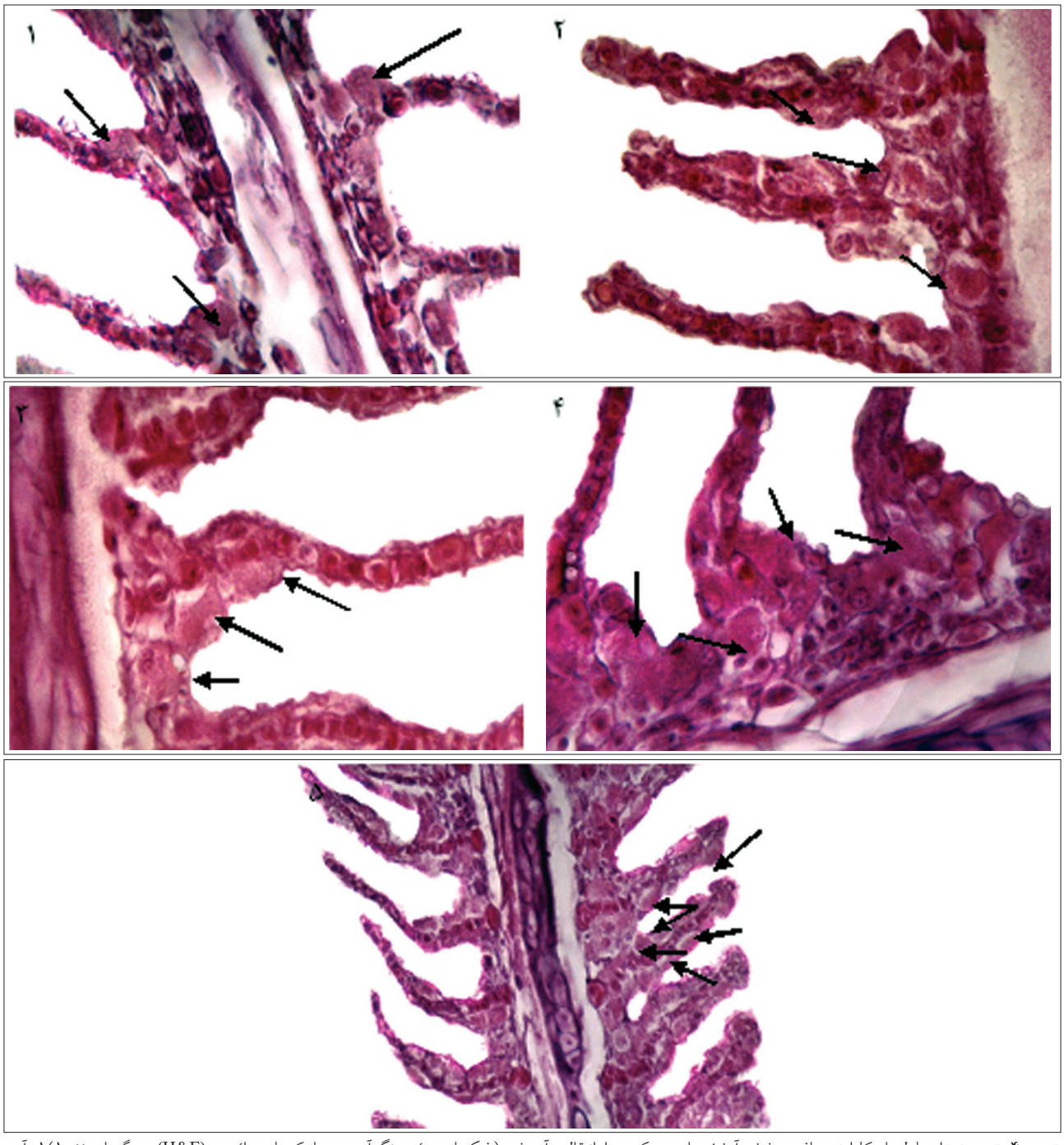
تصویر ۲ـ نمای کرانی پیش بینی میزان بقاء(٪) ماهی زروک در دوره ی سی روزه پس از انتقال مستقیم به آب شور.



تصویر ۳- توزیع تعداد کل سلول‌های کلراید میانگین ±انحراف معیار تیغه‌ای (بالا) و رشته‌ای (پایین) موجود در فضای بین تیغه‌ای بافت پوشی آبششی ماهی زروک در دوره ۱۵ روزه پس از انتقال به شوری‌های تحت آزمون (حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح $p<0.05$ می باشد).
۱۵ ۱۰ ۲ ۱ ۰٫۱

مقدار موجود در مقایسه با ماهیان سازگار شده با آب شور و لب شور برخوردار بود. لیکن تفاوت معنی داری در تعداد این سلول‌ها در ناحیه‌ی رشته‌ای در ماهیان سازگار شده با آب شیرین،لب شور و شور مشاهده نشد(۴،۱۷).

همچنین با مطالعه دیگری مبنی براین مساله که در طبیعت پدیده مهاجرت بصورت یک پروسه تدریجی و زمان بر،صورت می پذیرد و با تاکید بر تعامل موازی شدت تغییرات فیزیولوژیک با کاهش دمای محیط در طول مهاجرت پاییزه ی این گونه توانستند تغییرات قابل ملاحظه‌ای را در شدت



تصویر۴- توزیع تعداد سلول‌های کلراید در بافت پوششی آبشش ماهی زروک پس از انتقال به آب شور (فیکساتیو بوئن، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و بزرگنمایی ×۱۰۰) ۱ـ آب شیرین (تصویر بالا ـ چپ) ۲ـ شوری ۵ g/L (تصویر بالا ـ راست) ۳ـ شوری ۱۰ g/L (تصویر وسط ـ چپ) ۴ـ شوری ۲۰ g/L (تصویر وسط ـ راست) ۵ـ شوری ۳۰ g/L (تصویر پایین).

فرایند دخیل در تنظیم اسمزی ماهیان مهاجر زودرس و دیررس گزارش دهد (۲۵). بدین انتقال مستقیم شاه ماهی از آب شور به آب شیرین در دمای $22^{o}C$ با کاهش تعداد سلول‌های کلراید تیغه‌ای در ماهیان ،از میانگین ۲۲ سلول به ۲سلول و افزایش تعداد سلول‌های کلراید رشته‌ای تا میزان دو برابردر۴روز اول پس از انتقال مواجه گردید. حال اینکه انتقال مستقیم شاه ماهی از آب شور به آب شیرین در دمای $10^{o}C$ افزایش تعداد سلول‌های کلراید رشته‌ای تا میزان پنج برابر و ناپدید شدن کامل سلول‌های کلراید تیغه‌ای در۴روز اول پس از انتقال مواجه گردید. از طرفی مقایسه ی توزیع سلول‌های کلراید در تعدادی ماهیان آب شیرین اولیه، ماهیان آب شیرین پیرامونی، ماهیان آب شیرین ثانویه و ماهیان آب شور نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است. به نحوی که در ۱۵ گونه از میان ۲۲ گونه‌ی ماهی آب شیرین اولیه حضور سلول‌های کلراید تیغه‌ای در آب شیرین، لب شور و شور کاملاً محرز بود. لیکن حضور این سلول‌ها در موضع تیغه‌ای فقط در ۳ گونه از ۲۲ گونه ی ماهیان آب شیرین ثانویه تایید شد. با

این حال حضور یا عدم حضور این سلول‌ها در موضع تیغه‌ای ماهیان آب شیرین پیرامونی بصورت کاملاً متغیر و بدون یک قاعده‌ی عمومی پیش بینی شده، در گونه‌های مختلف تحت آزمون بخصوص گونه‌های متعلق به خانواده‌های سوف ماهیان، آزاد ماهیان، کپور ماهیان دندان دار و مار ماهیان نمایان شد. در هیچ کدام از ۷ گونه ماهیان آب شور حضور سلول‌های کلراید تیغه‌ای در آب شیرین، لب شور و شور محرز نگردید (۱۸). با وجود اینکه بسیاری از محققان از سلول‌های کلراید تیغه‌ای به عنوان سلول‌های کلراید غالب در ماهیان سازگار شده به آب شور یاد کرده‌اند، لیکن شاید نتوان استدلال کاملی برای حضور این دسته از سلول‌های کلراید در یک گروه از ماهیان خاص ارائه نمود. با این حال این دسته از سلول‌های کلراید به عنوان واحدهای اصلی و موثر جذب یون‌های تک ظرفیتی و کلسیم در ماهیان ساکن آب شیرین از قبیل قزل‌آلای قهوه‌ای (۱۶)، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۲)، ماهی آزاد چام (۲۳)، ماهی سوف ژاپنی (۱۳)، و گربه ماهی زره دار (۱۰) و به عنوان واحد موثر دفع آمونیاک در ماهی گل خورک (۲۴) به شمار می‌آید. از طرفی دخالت تیغه ی آبششی در فرایندهای فوق الذکر بالطبع با القاء هزینه‌های جانبی برای موجود همراه خواهد بود . بدین ترتیب شکوفایی سلول‌های کلراید تیغه‌ای در آب شیرین، با افزایش فاصله ی انتشاری آب و خون و نقصان در تهویه خون همراه شده، لذا، دخالت یکسری فرایندهای جبرانی از قبیل بالا رفتن تمایل گلبول‌های قرمز به جذب اکسیژن امری اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد (۲۱).

وجود تفاوت در عملکرد سلول‌های کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای در گونه‌های مختلف به طور معمول گزارش گردیده است. به عنوان مثال در یک مطالعه با گزارش افزایش توام تعداد سلول‌های کلراید در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Salmo gairdneri*) پس از انتقال به آب شور، مکانیسم عمل واحدی را برای سلول‌های کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای پیشنهاد نمودند (۱۶). همچنین با مطالعه ی فیزیولوژی آزاد ماهی چام (*Oncorhynchus keta*) سلول‌های کلراید تیغه‌ای را به عنوان واحدهای اصلی جذب یون در شرایط هیپواسموتیک و سلول‌های کلراید رشته‌ای را به عنوان واحدهای دفع یون در شرایط هیپراسموتیک قلمداد کردند (۲۳). مطالعات بعدی روی مار ماهی ژاپنی و روی ماهی سوف ژاپنی با تایید نظریه فوق همراه گردید. لیکن به نظر می‌رسد، فرضیه فوق تنها در مورد گونه‌های خاص که دارای سلول‌های کلراید تیغه‌ای هستند مصداق داشته باشد. از طرفی مقایسه توزیع سلول‌های کلراید حساس به آنتی بادی Na/K-ATPase و NKCC در قزل‌آلای رودخانه‌ای (*Salvelinus namaycush*)، قزل‌آلای جویباری (*Salvelinus fontinalis*) و ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*)، نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است. به نحوی که نتایج حاصل، توزیع همسان این سلول‌ها در هر سه گونه از آزاد ماهیان را تایید می‌کند، لیکن، انتقال مستقیم ماهی آزاد آتلانتیک از آب شیرین به آب شور، متعاقباً با ناپدید شدن کامل سلول‌های کلراید تیغه‌ای همراه خواهد شد. این پدیده به عنوان یک پدیده نوظهور در آزاد ماهیان مطرح می‌شود و می‌تواند، به عنوان استدلالی مناسب در تایید فرضیه‌ی سایر محققین قلمداد گردد (۲۳). با این وجود حضور مداوم سلول‌های کلراید تیغه‌ای در ماهی قزل‌آلای جویباری و رودخانه‌ای سازگار شده با آب شور می‌تواند، احتمال دخالت توام سلول‌های کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای را در دفع یون تقویت نماید. ناپدید شدن سلول‌های کلراید آب شور می‌تواند به عنوان یک مکانیسم سازگاری پیشرفته نیز برای این ماهیان در نظر گرفته شود چرا که جنس Salvelinus، از ابتدایی ترین آزاد ماهیان اشتقاق یافته به‌شمار می‌آیند و در مقابل ماهی آزاد آتلانتیک از پیشرفته ترین آزاد ماهیان به حساب می‌آید (۱۳). مطالعه ی تمایز و بازسازی سلول‌های کلراید در ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*) در محیط‌های مختلف حاکی از بازسازی مداوم سلول‌های کلراید در ماهیان سازگار شده به آب شور بود. در این مطالعه با وجود اینکه تعداد سلول‌های کلراید در ناحیه‌ی رشته‌ای و قاعده‌ی تیغه ی ماهیان سازگار شده با آب شیرین و شور تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، لیکن بالا بودن تراکم سلول‌های کلراید تیغه‌ای در ماهیان سازگار شده با آب شیرین امری مشهود به نظر می‌رسد. در طول پروسه ی سازگاری سلول‌های کلرید به طور عمده در موضع رشته‌ای قابل تشخیص بودند. نرخ بازسازی سلول‌های کلراید در ماهیان ساکن آب شیرین، در انواع آب ساکن شور و ماهیان سازگار شده با آب شور به ترتیب ۸٪، ۲۱٪ و ۲۸٪ برآورد گردید. لذا حضور یک چرخه‌ی کامل بازسازی سلول‌های کلراید در ماهیان سازگار شده با محیط‌های مختلف امری بدیهی به نظر می‌رسد و بالا بودن نرخ بازسازی در سلول‌های کلراید رشته‌ای در ماهیان ساکن آب شور می‌تواند استدلالی قطعی در تایید نظریه‌ی تکاملی باشد (۲۳).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خویش را از پرسنل محترم ایستگاه تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی و آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشگاه شهید چمران، بخاطر مساعدت‌ها و حمایت‌هایشان در انجام این تحقیق، اعلام می‌دارند.

References

1. Carmona, R., Garcia-Gallego, M., Sanz, A., Domezain, A., Ostos-Garrido, M.V. (2004) Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. J. Fish. Biol. 64: 553-566.
2. Chang, I.C., Lee, T.H., Yang, C.H., Wei, Y.Y., Chou, F.I., Hwang, P.P. (2001) Morphology and function of gill mitochondria-rich cells in fish acclimated to different environments. Physiol. Biochem. Zool. 74:111-119.
3. Chervinski, J. (1983) Salinity tolerance of the mosquito fish, *Gambusia affinis* (Baird and Girad). J. Fish.

Biol. 22: 9-11.

4. Chen, C.N., Lin, L.Y., Lee, T.H. (2004) Ionocyte distribution in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal, 1775). Zool. Stud. 43: 773-777.
5. Denson, M., Stuart, K., Smith, T. (2003) Effects of salinity survival,growth and hematological parameters of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. JWAS. 34: 496-504.
6. Evans, D.H., Claiborne, J.B. (2006) The Physiology of Fishes (3th ed.). CRC press. New York, USA.
7. Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P. (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85: 97-177.
8. Evans, D.H. (2008) Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 295:704-713.
9. Fielder, D.S., Allan, G., Pepperall, D., Pankhurst, P.M. (2007) The effects of changes in salinity on osmoregulation and chloride cell morphology of juvenile Australian snapper, *Pagrus auratus*. Aquaculture. 272: 656-666.
10. Fernandes, M.N., Perna-Martins, S.A. (2001) Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus* CF. *plecostomus* (Loricariidae). Rev. Bras. Biol. 61:69-78.
11. Girard, J.P., Payan, P. (1980) Ion exchanges through respiratory and chloride cells in freshwater- and seawater-adapted teleosteans. Am. J. Physiol. 238: R260-R268.
12. Greco, A.M., Gilmour, K.M., Fenwick, J.C. Perry, S.F., (1995) The effects of softwater acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol. 198: 2557-2567.
13. Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y. (2003) Molecular biology of major components of chloride cells. J. Comp. Biochem. Physiol. 136: 593-620.
14. Inoue, K., Takei, Y. (2003) Diverse adaptability in Oryzias species to high environmental salinity. Zool. Sci. 11: 35-41.
15. Kevin, M.P., Alan, T.H., Paul, L.K., Paul, L.L. (2008) Adaptation as a potential response to sea-level rise: a genetic basis for salinity tolerance in populations of a coastal marsh fish. Evol Appl. 1: 155-160.
16. Laurent, P., Perry, S.F. (1990) The effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake on the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. Cell. Tissue. Res. 259: 429-442.
17. Lin, Y.M., Chen, C.N., Lee, T.H. (2003) The expression of gill Na,K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and freshwater. Comp. Biochem. Physiol. 135: 489-497.
18. Lin, H.C., Sung, W.T. (2003) The distribution of mitochondria-rich cells in the gills of air-breathing fishes. Physiol. Biochem. Zool. 76: 215-228.
19. Parry, G. (1960) The development of salinity tolerance in the salmon, *Salmo Salar* (L.) and some related species. J. Exp. Biol. 37: 425-434.
20. Perry, S.F., Lopez, L.R., McNeill, B., Wilson, J. (2006) Fooling a freshwater fish: how dietary salt transforms the rainbow trout gill into a seawater gill phenotype. J. Exp. Biol. 209: 4591-4596.
21. Perry, S.F., Laurent, P. (1989) Adaptational responses of rainbow trout to lowered external NaCl concentration: contribution of the branchial chloride cells. J. Exp. Biol. 147: 147-168.
22. Tsuzuki, M.Y., Cerqueira, V.R., Teles, A., Doneda, S. (2007) Salinity tolerance of laboratory reared juveniles of the fat snook *centropomus parallelus*. Braz. J. Oceanogr. 55: 97-102.
23. Uchida, K., Kaneko, T., Yamauchi, K., Hirano, T. (1996) Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na^+ K^+-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. J. Exp. Zool. 276: 193-200.
24. Wilson, J.M., Randall, D.J., Donowitz, M., Vogl, A.W., Ip, A.K.Y. (2000) Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). J. Exp. Biol. 203: 2297-2310.
25. Zydlewski, J., McCormick, S.D.(1997)The ontogeny of salinity tolerance in the American shad (*Alosa sapidissima*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54: 182-189.

J. Vet. Res. 67, 2:109-117, 2012

Alterations to chloride cells of the secondary lamella and gill branches of spotted scat (*Scatophagus argus* L.) in different salinities

Morovvati, H.[1*], Zolgharnein, H.[2], Noori Moghahi, M.H.[3], Abdi, R.[2], Ghazilou, A.[4]

[1]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medecine, Shahid Chamran university of Ahvaz, Ahvaz- Iran.*

[2]*Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khoramshahr Marine Science and Technology University, Khoramshahr- Iran.*

[3]*Department of Basic Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran - Iran.*

[4]*Gratuated from the Khoramshahr Marine Sciences and Technology University, Khoramshahr- Iran.*

(Received 25 September 2011 , Accepted 15 December 2011)

Abstract:

BACKGROUND: Estuarine euryhaline teleosts as reared spotted scat will be continnously encounterd with alterations to water salinities. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to evaluate osmoregulatory capacity of the spotted scat in response to different salinities. **METHODS:** 120 fish were categorized into 4 groups of 30 fish each. The fish were transferred from the freshwater to different salinities (5, 10, 20, and 30 g/L) and kept for one month. Tissue sections of the secondary lamella and gill branches were staind using hematoxyline eosin and studied by the light microscope. **RESULTS:** Transfer from freshwater to different salinities made significant increase ($p<0.05$) in total chloride cells of the secondary lamella. Furthermore, while chloride cells alterations have been accompanied with decrease in the chloride cell numbers of the lamella such changes made an increase in chloride cell numbers of the gill branches. **CONCLUSIONS:** It can be concluded that the mentioned species has limited osmoregulatory capacity when encountering abrupt salinity changes.

Key words: osmoregulation, *Scatophagus argus* L., euryhaline, estuarine.

Figure Legends and Tabel Captions

Figure 1. Survival rates of spotted scat when exposed to five salinity regimes during 30-day acclimation period. day: 0 1 2 10 15 20

Figure 2. Counter plot of survival rates for spotted scat when exposed to saltwater.

Figure 3. Time course of the filament (top) and lamellar (bottom) chloride cell density (mean±SD) changes during 15 day saltwater adaptation. similar letters indicate no significant difference among groups at $p<0.05$ level. 0 1 2 10 15

Figure 4. Light photomicrograph of the spotted scat's when exposed to gill freshwater (1), and salinities of 5g/L (2), 10 g/L (3), 20 g/L (4), and 30 g/L (5) Arrows show chloride cells.

Table 1. Time dependent linear changes in chloride cell numbers of the lamella and filament over 10 days when encountered with different salinities.

Table 2. The correlation rate between cells number (in two location of filament and lamella in 10 days of adaptation period) and different salinities.

***Corresponding author's email: hmorovvati@scu.ac.ir, Tel: 0611-3330073, Fax: 0611-3332044**