



## اثر محرومیت غذایی بر توسعه سلول‌های کلراید آبششی در بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) در مواجهه با تنش شوری

محمد محیسنی<sup>۱\*</sup>، مهدی بنایی<sup>۱</sup>، بهزاد نعمت دوست حقی<sup>۱</sup>، سید محمد وحید فارابی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان

<sup>۲</sup> موسسه تحقیقات شیلات ایران، پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر، ساری

### چکیده

### نوع مقاله:

### پژوهشی

### تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۰۲/۱۴

اصلاح: ۹۴/۰۶/۱۸

پذیرش: ۹۴/۰۷/۱۰

### کلمات کلیدی:

سلول کلراید

ماهی سفید

پمپ سدیم-پتاسیم

سازش پذیری با آب شور یک مرحله بسیار حساس و بحرانی در زندگی بچه ماهیان رودکوک نظیر ماهی سفید دریای خزر می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی اثر محرومیت غذایی بر توسعه سلولهای کلراید آبششی در زمان سازش پذیری با آب شور انجام شده است. به این منظور بچه ماهیان سفید به دو گروه تقسیم بندی شدند: گروه کنترل در تمام طول دوره آزمایش در حد سیری ظاهری غذایی شده و در گروه آزمایشی بچه ماهیان تحت تاثیر تیمار گرسنگی قرار گرفتند. بچه ماهیان به مدت ۷ روز در معرض تنش شوری قرار گرفته و نمونه برداری از بچه ماهیان در روزهای دوم، سوم، چهارم و هفتم پس از تنش انجام شد. در نهایت فعالیت آنزیم پمپ سدیم پتاسیم آبششی، تعداد و اندازه سلولهای کلراید آبششی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محرومیت غذایی موجب کاهش سطح فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی و کاهش قطر، مساحت و محیط سلولهای کلراید آبششی شد ( $P < 0.05$ ). نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که محرومیت غذایی در بچه ماهیان سفید در زمان مواجهه با آب شور می‌تواند موجب ایجاد اختلال در توسعه سلولهای کلراید آبششی و در نتیجه عدم موفقیت در زمان سازش پذیری با آب شور گردد.

### مقدمه

سلولهای کلراید اپیتلیوم آبششی کلید فرآیند تنظیم اسمزی در ماهیان استخوانی محسوب می‌شوند. این سلولها به دلیل وجود تعداد زیادی میتوکندری در ساختار خود به سلولهای غنی از میتوکندری معروف هستند. همچنین غلظت بالای  $\text{Na-K-ATPase}$  نیز یکی دیگر از ویژگیهای بارز این دسته از سلولها به حساب می‌آید. سلولهای کلراید در ترشح یونها در آب شور و همچنین جذب یونها در آب شیرین نقش دارند (Uchida et al., 1998). تمایز ساختاری و عملکردی آبشش ماهیان به شکل قابل ملاحظه‌ای تحت تاثیر شوری محیط می‌باشد. سلولهای غنی از میتوکندری یا سلولهای کلراید مکان عمده ترشح یونها در ماهیان دریایی و جذب یونها در ماهیان آب شیرین می‌باشند (Evans et al., 2005). اندازه، تعداد، شکل (فرا ساختار) و نحوه توزیع این سلولها در پاسخ به تغییرات شوری محیط، تغییر می‌کند (Wang et al., 2009). این تغییرات در پاسخ به تغییر سطح هورمونهای بدن و به ویژه هورمون کورتیزول رخ می‌دهد. سطح این هورمون در طول مرحله تبدیل پار به اسمولت در

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [Mohiseni@ut.ac.ir](mailto:Mohiseni@ut.ac.ir)

آزادماهیان به شکل قابل ملاحظه ای افزایش پیدا می کند و این افزایش ارتباط مستقیمی در فرآیند توانایی تنظیم اسمزی ماهی در آب شور ایفا می کند (Uchida *et al.*, 1998). عملکرد این هورمون در کنار هورمونهای نظیر هورمون رشد و فاکتور رشد شبه انسولینی موجب تکثیر، تمایز و افزایش حجم سلولهای کلراید آبششی در پاسخ به شوری شده و در نتیجه این امر با افزایش سطح آنزیم پمپ سدیم پتاسیم آبششی، میزان اضافی یونهای سدیم و کلر از بدن به بیرون رانده می شود (McCormick, 2001).

ظرفیت سازش پذیری ماهیان استخوانی یوری هالین نسبت به تغییر در شوری محیط به عوامل متعددی نظیر محتوای انرژی بدن ماهی و میزان انرژی مورد نیاز وابسته است. انرژی مورد نیاز برای سازش با محیط معلول میزان شوری آب و همچنین مقدار انرژی است که می بایست توسط موجود صرف شود تا محتوای الکترولیتهای داخلی بدن ماهی دستخوش تغییرات شدید نگردد (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2005). از این رو سازش با آب شور یک فرآیند انرژی خواه بوده و موفقیت در این فرآیند به تغییر موثر در نرخ سوخت و ساز ماهی جهت جبران تغییرات شوری مرتبط می باشد. حفظ هومئوستازی انرژی در زمان گرسنگی مستقیماً با ظرفیت انتقال انرژی از طریق منابع ذخیره نظیر چربیها و گلیکوژن کبدی (دست کم در مراحل ابتدایی گرسنگی) ارتباط دارد (Polakof *et al.*, 2006). پس از اتمام ذخایر انرژی، ماهی توانایی لازم جهت سازش با محیط را از دست داده و استرس شدیدی به ماهی وارد می گردد. مطالعات نشان می دهند که گرسنگی در بچه ماهیان رهسپار شونده به سوی دریا موجب عدم عملکرد مناسب ارگانهای درگیر در سازش با آب شور شده و در نتیجه برآیند نهایی این مسئله عدم موفقیت کامل بچه ماهی در سازش با آب شور خواهد بود که به شدت از بازگشت شیلاتی آنها می کاهد (Stefansson *et al.*, 2009).

نتایج مطالعات متعدد حاکی از اثر منفی گرسنگی بر موفقیت در سازش با آب شور در گونه های مختلف ماهیان می باشد. Juell و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که اسمولتهای آزادماهیان در زمان سازش با آب شور به شکل بالقوه ای نسبت به گرسنگی حساس هستند. کاهش در محتوای گلیکوژنی کبد و همچنین کاهش میزان چربیهای ذخیره ای بدن در ماهی آزاد اطلس در زمان سازش با آب شور گزارش شده است (Stefansson *et al.*, 2003). گرسنگی در ماهی سیم دریایی موجب کاهش توانایی ماهی در تطبیق با آب شور شد (Polakof *et al.*, 2006). همچنین گرسنگی در زمان سازش با آب شور در اسمولتهای ماهی آزاد اطلس موجب کاهش معنی دار فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی و افزایش قابل توجه غلظت یون کلرید پلازما در مقایسه با گروه کنترل گردید (Stefansson *et al.*, 2009). نتایج مشابهی در خصوص سایر گونه های دیگر ماهیان استخوانی نظیر تیلاپپای موزامبیک (Kültz and jurss, 1991) و قزل آلابی رنگین کمان (Nance *et al.*, 1987) گزارش شده است.

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum Kamenskii* 1901) یک گونه رودکوج است که طی ماههای اسفند و فروردین وارد رودخانه های منتهی به دریای خزر شده و بر روی گیاهان آبی، بسترهای شنی و سنگریزه ای تخمیزی می نماید (Darvish Bastami *et al.*, 2011). نوزادان حاصله با طی مراحل تکاملی و رشد و نمو خود، رودخانه های محل تولد را به مقصد دریا ترک می نمایند و به این ترتیب چرخه زندگی آنها ادامه می یابد (Jafari *et al.*, 2009). طی دهه های گذشته ذخایر این ماهی در اثر برداشت بی رویه و همچنین دگرگونی مناطق تخمیزی در رودخانه ها و تالابها بر اثر برداشت شن و ماسه و وارد شدن سموم کشاورزی، خانگی و صنعتی روند کاهشی را طی نموده است. با توجه به اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی این ماهی، شیلات ایران از سال ۱۳۶۱ با انجام تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان انگشت قد، برنامه مدونی را جهت بازسازی ذخایر این ماهی آغاز نموده (Abdolmalaki, 2006) و سالانه حدود ۲۰۰ میلیون قطعه بچه ماهی سفید در رودخانه های گیلان و مازندران رهاسازی می کند (Mazandaran Fisheries, 2010). مطابق با منابع منتشر شده، سالانه هزینه قابل توجهی به پرورش و رهاسازی بچه ماهیان انگشت قد اختصاص می یابد که این میزان تنها در سال ۱۳۸۴ برابر با ۱۲۳ ریال به ازاء هر بچه ماهی انگشت قد تولید شده بوده است (Salehi, 2008). علیرغم این مسئله در ارتباط با سازگاری اسمزی بچه ماهیان در مواجهه با آب شور در داخل کشور اطلاعات مختصری موجود می باشد. Amiri و همکاران (۲۰۰۸)، تاثیر شوریهای مختلف بر میزان بازماندگی بچه ماهیان سفید رهاسازی شده به دریای خزر را مورد بررسی قرار دادند. Ataimehr و همکاران (۲۰۱۰)

برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی موثر در فرآیند سازگاری اسمزی بچه ماهیان سفید جهت دستیابی به وزن بهینه برای رهاسازی این گونه را مورد بررسی قرار داده است. Mohiseni و همکاران (۲۰۱۵)، موفقیت سازگاری اسمزی بچه ماهیان سفید را در رودخانه تنج مورد بررسی قرار دادند. بر مبنای سنجش فاکتورهای فیزیولوژیکی، نتایج حاکی از عدم موفقیت کامل بچه ماهیان در سازگاری گونه مورد مطالعه با آب لب شور بود.

## مواد و روش‌ها

### سازش سازی و تیمار بندی ماهیان

در این پژوهش از بچه ماهیان سفید با وزن تقریبی ۰/۵ گرم (وزن معمول رهاسازی بچه ماهیان) استفاده شد. بچه ماهیان به دو گروه کنترل و آزمایشی تقسیم گردیدند. هر دو گروه به مدت ۱۵ روز، جهت انجام سازش پذیری با شرایط آزمایش نگهداری شده و در طول این مدت به میزان ۲ درصد وزن بدن با خوراک مرحله آغازین ماهی قزل آلا (رنگین کمان (بیومار، فرانسه) تغذیه شدند (Martinez-Alvarez *et al.*, 2005). تعویض آب به صورت روزانه و به میزان ۳۰ درصد حجم آب مخازن نگهداری بود. پس از اتمام دوره سازگاری، بچه ماهیان هر دو گروه به طور همزمان به آب با شوری ۱۲ گرم در لیتر (شوری غالب بخش جنوبی دریای خزر) انتقال داده شدند. آب شور مورد استفاده در این بررسی از فاصله یک کیلومتری خط ساحلی (به سمت دریا) در منطقه فرح آباد شهرستان ساری تهیه شد. تنش شوری در بچه ماهیان به مدت ۷ روز به طول انجامید و طی این مدت بچه ماهیان گروه کنترل تا حد سیری با غذای یاد شده تغذیه شدند. اما در مورد گروه آزمایشی (گروه انجام محرومیت غذایی) تا انتهای دوره آزمایش غذایی انجام نشد. هر دو گروه آزمایشی و کنترل با سه تکرار انجام گرفت.

### نمونه برداری و سنجش‌های بافتی و بیوشیمیایی

پس از شروع نمونه برداری از ماهیان در روزهای دوم، سوم، چهارم و هفتم پس از شروع تنش شوری صورت گرفت. جهت سنجش فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبشش (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase)، پس از بیهوش نمودن ماهیان با استفاده از عصاره گل میخک و نخاعی کردن آنها، تیغه‌های آبششی سمت چپ برداشته شده و در بافر SEI (شامل ۲۵۰ میلی مول ساکارز، دی سدیم اتیلن دی آمین ترا استات یا EDTA ۱۰ میلی مولار، ایمیدازول ۵۰ میلی مولار با pH=7.3) قرار داده شده و بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند (Lerner *et al.*, 2007). سنجش میزان فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۳۴۰ نانومتر و به شیوه ریز آزمایش<sup>۱</sup> طبق روش Bergmeyer (۱۹۸۴) انجام شده و برای سنجش میزان پروتئین کل آبشش از روش لوری (تغییر داده شده برای استفاده در میکروپلیت ریدر) استفاده شد (Lowry *et al.*, 1951). جهت انجام مطالعات بافت شناسی، نمونه‌های آبشش ماهیان پس از برداشت به منظور تثبیت بافتی، در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شدند. پس از تثبیت نمونه‌ها جهت بررسی وضعیت سلولهای کلراید آبششی و به منظور تهیه مقاطع بافتی از روش معمول بافت شناسی و رنگ آمیزی همتوکسیلین و ائوزین بهره گرفته شد (Pousti and Adib Moradi, 2000). پس از عکس برداری از مقاطع گرفته شده با استفاده از میکروسکوپ نوری (در بزرگنمایی ۴۰)، اندازه گیری ابعاد سلولهای کلراید آبششی با استفاده از نرم افزار Image J (نسخه ۱/۴۱) انجام شد.

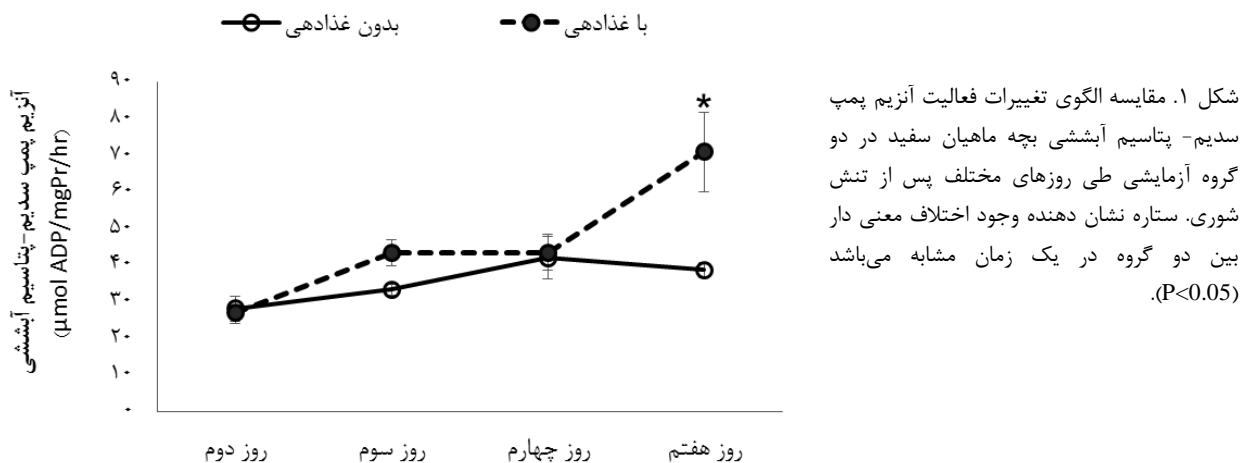
تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده پس از بررسی نرمال بوده داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، مقایسه نتایج حاصله با استفاده از آزمون t مستقل انجام شد. به منظور بررسی همبستگی بین فاکتورهای اندازه گیری شده نیز از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

## نتایج

شکل ۱ فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی را در بچه ماهیان در زمانهای مختلف پس از تنش شوری نشان می‌دهد. در گروه ماهیان تغذیه شده پس از شروع تنش شوری تا روز هفتم روند افزایشی در میزان فعالیت آنزیم دیده شده و در روز هفتم

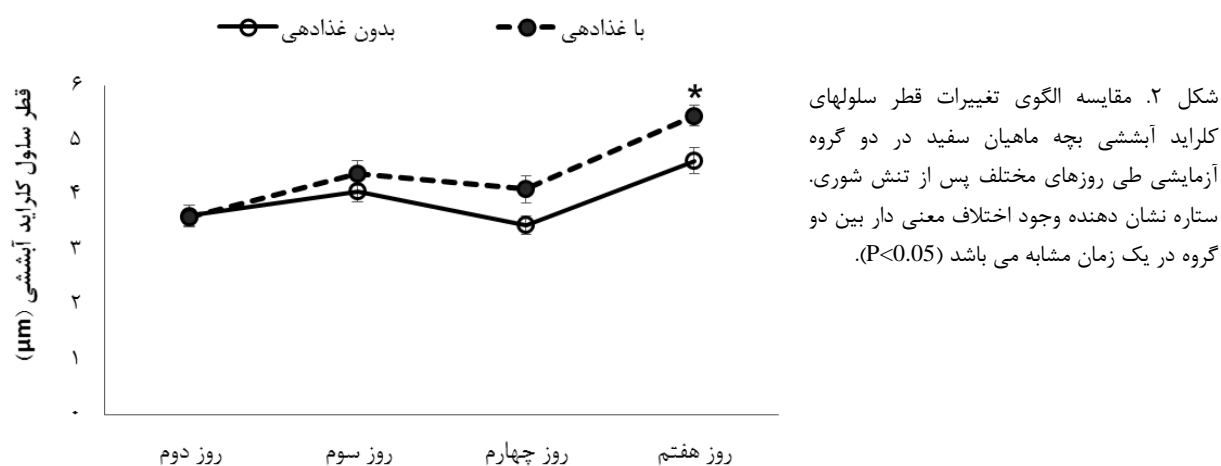
<sup>1</sup> Microassay

اختلاف معنی داری با گروه تغذیه نشده نشان داد ( $P < 0.05$ ). در گروه تغذیه نشده افزایش جزئی در فعالیت آنزیم دیده شده اما این افزایش بسیار کمتر از گروه بچه ماهیان تغذیه شده بود.

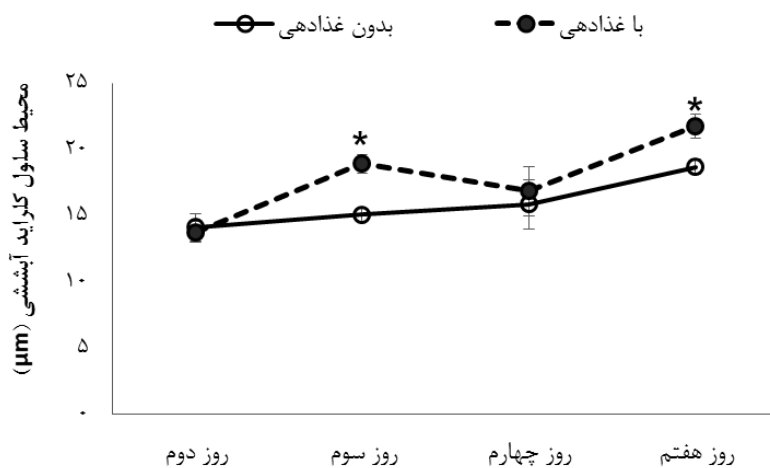


شکل ۱. مقایسه الگوی تغییرات فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی بچه ماهیان سفید در دو گروه آزمایشی طی روزهای مختلف پس از تنش شوری. ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین دو گروه در یک زمان مشابه می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

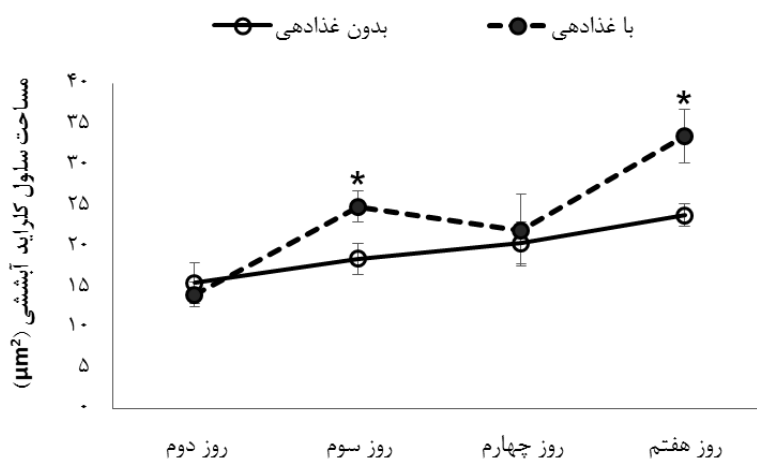
بررسی اندازه (قطر، محیط و مساحت) سلولهای کلراید آبششی نشان داد که در هر دو گروه آزمایشی پس از شروع تنش شوری افزایش در قطر سلولهای کلراید آبششی تا روز هفتم دیده شد، اما میزان افزایش در گروه بچه ماهیان تغذیه شده بیشتر از گروه بدون غذادهی بود و در روز هفتم اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده شد (شکل ۲). در خصوص محیط و مساحت سلولهای کلراید آبششی نیز رویه مشابهی دیده شد. افزایش محیط و مساحت سلولهای کلراید آبششی در هر دو گروه پس از تنش شوری تا روز هفتم دیده شد اما مقدار افزایش در گروه بچه ماهیان تغذیه شده از روز دوم به بعد در تمامی زمانها بیشتر از گروه بدون غذادهی بوده به طوری که در روزهای سوم و هفتم پس از تنش شوری میزان این افزایش معنی دار بود (شکل‌های ۳ و ۴). نتایج حاصل از آزمون همبستگی پیرسون (شکل‌های ۵ و ۶) نشان داد بین میزان فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم آبششی و قطر و مساحت سلولهای کلراید آبششی رابطه خطی مثبتی وجود دارد. از نظر تعداد سلولهای کلراید آبششی نیز افزایش تعداد تا روز هفتم پس از تنش شوری دیده شد که البته میزان افزایش در گروه بچه ماهیان بدون غذادهی کمتر از گروه تغذیه شده بوده و در روز چهارم اختلاف معنی داری مشاهده شد (شکل ۷).



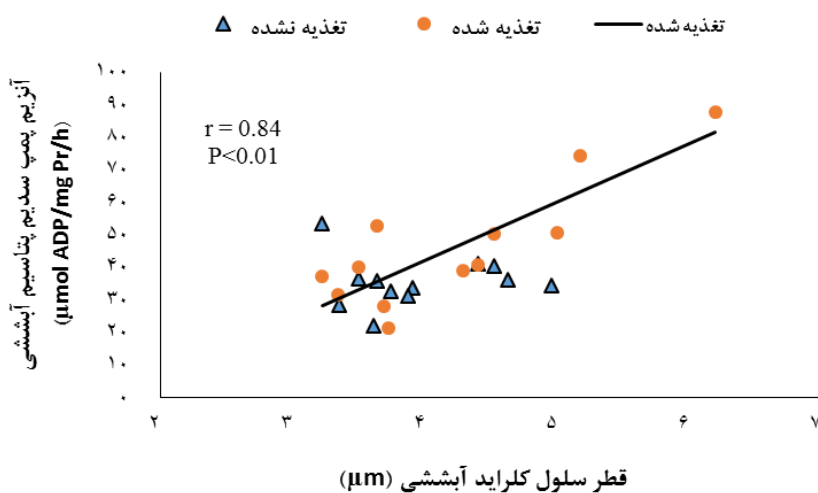
شکل ۲. مقایسه الگوی تغییرات قطر سلولهای کلراید آبششی بچه ماهیان سفید در دو گروه آزمایشی طی روزهای مختلف پس از تنش شوری. ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین دو گروه در یک زمان مشابه می‌باشد ( $P < 0.05$ ).



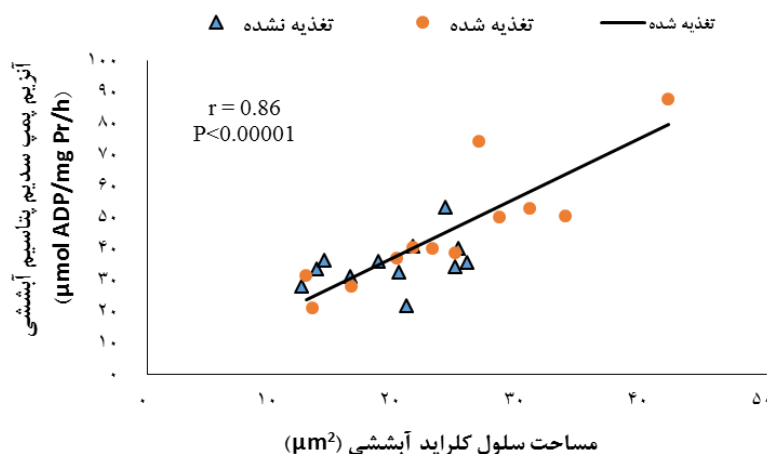
شکل ۳. مقایسه الگوی تغییرات محیط سلولهای کلراید آبششی بچه ماهیان سفید در دو گروه آزمایشی طی روزهای مختلف پس از تنش شوری. ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین دو گروه در یک زمان مشابه می باشد ( $P < 0.05$ ).



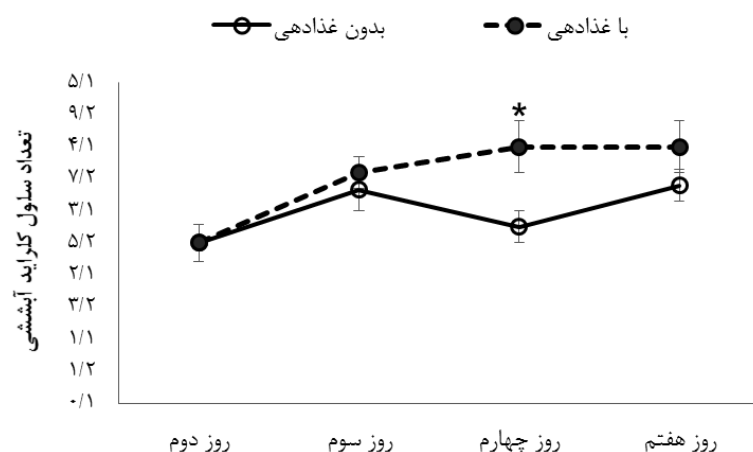
شکل ۴. مقایسه الگوی تغییرات مساحت سلولهای کلراید آبششی بچه ماهیان سفید در دو گروه آزمایشی طی روزهای مختلف پس از تنش شوری. ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین دو گروه در یک زمان مشابه می باشد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۵. همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم و قطر سلولهای کلراید آبششی



شکل ۶. همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم پمپ سدیم پتاسیم و مساحت سلولهای کلراید آبششی



شکل ۷. مقایسه الگوی تغییرات تعداد سلولهای کلراید آبششی بچه ماهیان سفید در دو گروه آزمایشی طی روزهای مختلف پس از تنش شوری. ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین دو گروه در یک زمان مشابه می باشد (P < 0.05).

## بحث

ورود ماهی به آب شور مستلزم تغییرات قابل توجهی در سیستم تنظیم اسمزی ماهی است به نحوی که این سیستم از حالت هایپر اسموتیک (در آب شیرین) به حالت هایپواسموتیک تغییر می یابد (Hwang and Lee, 2007). با توجه به افزایش جریان یونی به محیط داخلی بدن ماهی در آب شور، افزایش سطح فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی جهت دفع یونهای اضافی مسئله ای است که مورد تایید گزارشات علمی بی شماری قرار گرفته است (Madsen *et al.*, 1995; Tipsmark and Madsen, 2001; Tipsmark *et al.*, 2002; Hiroi and McCormick, 2007; Bodinier *et al.*, 2010). با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی افزایش فعالیت آنزیم پس از تنش شوری در گروه بچه ماهیان تغذیه شده کاملاً روند افزایشی داشته در حالی که در گروه بچه ماهیان تغذیه نشده این افزایش چشمگیر نیست. افزایش فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم آبششی نیازمند انرژی زیادی بوده و از این رو به نظر می رسد که این فرآیند افزایش در سطح متابولیسم بدن ماهی را به دنبال دارد (Laiz-Carrión *et al.*, 2003). در همین راستا افزایش سهم انرژی مورد نیاز برای تنظیم اسمزی از متابولیسم پایه در ماهی قزل آلائی رنگین کمان از آب شیرین به شور ۲۰ به ۲۷ و تیلاپپای نیل ۱۹ به ۲۹ درصد گزارش شده است (Febry and Lutz, 1987). انرژی مورد نیاز برای فرآیندهای مختلف زیستی از جمله تنظیم اسمزی از طریق تغذیه تأمین می گردد. مطالعات نشان داده اند که میزان اسیدهای آمینه موجود در بدن ماهیانی که گرسنه هستند نسبت به ماهیان غذایی شده به شکل معنی داری کمتر است (Jürss *et al.*, 1983). از سوی دیگر افزایش شوری محیط، افزایش سطح اسیدهای آمینه را به ویژه در بافت های عضلانی ماهی به دنبال دارد (Kaushik, 1977). صرف نظر از کارکرد متابولیکی، اسیدهای آمینه نقش بسیار مهمی در تنظیم فشار

اسمزی در سلول‌ها ایفا می‌کنند. بسیاری از عوامل و ناقلینی که در ترشح نمک‌های اضافی در آب شور دخیل هستند ماهیت پروتئینی داشته و از این رو بدیهی است که در صورت عدم تغذیه کافی، کاهش در سطح اسیدهای آمینه و اختلال در ساخت پروتئین‌های دخیل در تنظیم اسمزی در آب شور را به دنبال خواهد داشت (Kaushik, 1977; Jürss *et al.*, 1983). همکاران (۱۹۸۳) کاهش ۴۴ درصدی در فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی را در ماهیان فزل آلی رنگین کمان گرسنه در مقایسه با ماهیان تغذیه شده در مواجهه با آب شور گزارش کردند. در مطالعه ای دیگر بر روی ماهی سیم دریایی همبستگی مثبتی بین افزایش شوری محیطی، افزایش فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی و همچنین افزایش سطح متابولیسم و مصرف انرژی گزارش شد (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2005). نتایج تحقیقی مشابه بر کاهش معنی دار میزان فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی در ماهی سیم دریایی در نتیجه یک دوره گرسنگی ۱۴ روزه تأکید داشت (Polakof *et al.*, 2006). بنابراین با عنایت به موارد یاد شده کاهش معنی دار در میزان فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی در گروه بچه ماهیان تغذیه نشده قابل توجه به نظر می‌رسد.

گزارشات علمی نشان می‌دهند که سلول‌های کلراید آبششی از طریق تغییر سلول‌های جانبی<sup>۲</sup> که در نزدیکی سلول‌های کلراید در اپیتلیوم پایه آبششی قرار دارند، توسعه می‌یابند. این سلول‌ها به طور مداوم جایگزین سلول‌های کلرایدی می‌شوند که در نتیجه تأثیر مخرب عوامل محیطی آسیب دیده و در حال نکروزه شدن بوده و یا اینکه به مرور زمان دچار پیری شده‌اند (Rojo *et al.*, 1997). از سوی دیگر توسعه سلول‌های کلراید تحت تأثیر ترشحات هورمونی می‌باشد. در این راستا هورمون کورتیزول موجب تحریک تمایز و تکثیر این سلول‌ها می‌شود (Madsen, 1990; Mancera and McCormick, 1999). عملکرد این هورمون موجب افزایش قابلیت تحمل شوری، افزایش فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم (NaK-ATPase) و تغییر در شکل و تعداد سلول‌های کلراید در گونه‌های مختلف ماهیان می‌گردد. کاهش در سطح پایه این هورمون موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در ترشح سدیم و همچنین کاهش فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم گشته و از این رو میزان ورود سدیم به بدن ماهی افزایش می‌یابد (Dean *et al.*, 2003).

همانگونه که در بخش نتایج ذکر شد بین میزان فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم آبششی و قطر و مساحت سلول‌های کلراید آبششی رابطه خطی مثبتی دیده شد (شکل‌های ۵ و ۶). به بیان دیگر با افزایش قطر و مساحت سلول‌های کلراید آبششی، میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت. همانگونه که پیشتر ذکر شد اندازه، تعداد، شکل (فرا ساختار) و نحوه توزیع سلول‌های کلراید آبششی در پاسخ به تغییرات شوری محیطی، تغییر می‌کند (Wang *et al.*, 2009). در آب شور، سلول‌های کلراید به طور کلی توسعه پیدا نموده و به شکل قابل توجهی افزایش در تعداد و اندازه آنها ایجاد می‌گردد (McCormick, 2001). مطالعات نشان داده‌اند که در زمان انتقال ماهیان از آب شیرین به آب شور، بیان ژن مولد آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا می‌کند (Tipsmark *et al.*, 2002). این زمان مقارن با افزایش در میزان پارامترهایی (نظیر هورمون کورتیزول، هورمون رشد و هورمون‌های تیروئیدی است) که در تحریک تمایز و افزایش سایز سلول‌های کلراید آبششی دخیل هستند. با افزایش اندازه سلول‌های کلراید آبششی فضای کافی برای توسعه سیستم میکروتوبولی در داخل سیتوپلاسم فراهم شده و با ادامه توسعه این سیستم به غشاهای جانبی، سطح بزرگی برای جایگزینی پروتئین‌های درگیر در نقل و انتقالات یونی فراهم می‌گردد که آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی یکی از مهمترین پروتئین‌های درگیر در این فرآیند می‌باشد. همانطور که ذکر شد این آنزیم با ایجاد گرادیان منفی و با صرف انرژی در جذب (آب شیرین) و ترشح (آب شور) یونها در سلول نقش مهمی را ایفا می‌کند (Kaneko *et al.*, 2008). بنابراین توسعه تعداد و اندازه سلول‌های کلراید آبششی، افزایش سطح فعالیت آنزیم پمپ سدیم-پتاسیم آبششی را به دنبال دارد.

در زمان انتقال ماهی از آب شیرین به شور، سلول‌های کلراید آبششی از تمایز سلول‌های سنگفرشی ایجاد می‌شوند. پس از تماس با آب شور نرخ این تمایز افزایش یافته و از این رو با گذشت زمان بر تعداد سلول‌های کلراید آبششی افزوده می‌شود (Daborn *et al.*, 2001). پس از گذشت چند روز، تعداد سلول‌های کلراید به حد ثابتی رسیده و از این پس نرخ افزایش در اندازه سلول تسریع

<sup>2</sup> - Accessory cells

می گردد (Foskett *et al.*, 1981). با توجه به نتایج این بررسی به نظر می رسد که تقریباً تا روز چهارم افزایش تعداد سلولهای کلراید آبششی در هر دو گروه آزمایشی دیده شده و پس از آن تا روز هفتم به سطح نسبتاً ثابتی رسیده است. بررسی میزان تمایز سلولهای کلراید آبششی در ماهی سیچلید در زمان تطبیق با آب شور نشان داد که تنها تا روز سوم پس از مواجهه با آب شور افزایش در تعداد سلولهای کلراید آبششی دیده شده است (Foskett *et al.*, 1981). به طور کلی از نظر تغییر در تعداد سلولهای کلراید آبششی به نظر می رسد که تفاوتی بین دو گروه بچه ماهیان تغذیه شده و گروه فاقد غذایی وجود نداشته باشد، اگرچه در روز چهارم تعداد این سلولها در گروه بچه ماهیان تغذیه شده به شکل معنی داری بیش از گروه بچه ماهیان تغذیه نشده بود.

به طور کلی نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که محرومیت غذایی در بچه ماهیان سفید در زمان سازش پذیری با آب شور کاهش میزان فعالیت آنزیم پمپ سدیم- پتاسیم آبششی را به دنبال دارد. ارزیابی مقاطع تهیه شده از آبششها نشان داد که در نتیجه محرومیت غذایی، کاهش در قطر، مساحت و محیط سلولهای کلراید آبششی ایجاد شده اما تعداد سلولهای کلراید علیرغم کاهش معنی دار در روز چهارم، در انتهای آزمایش (روز هفتم) تغییری نشان نداد. با عنایت به نتایج به دست آمده از این بررسی می توان این گونه استنباط نمود که محرومیت غذایی در بچه ماهیان سفید در زمان مواجهه با آب شور می تواند موجب ایجاد اختلال در تنظیم اسمزی ماهی و سازش پذیری با آب شور گردد. همانگونه که در قسمت نتایج و بحث عنوان شد، نتایج مشابهی در مورد برخی از گونه های دیگر نظیر آزادماهی اطلس، سیم دریایی، وزغ ماهی و ... در نتیجه محرومیت غذایی ایجاد شده است. نظر به اهمیت و ارزش بالای اقتصادی ماهی سفید دریای خزر و با توجه به کاهش ذخایر این ماهی طی سالهای اخیر و همچنین با توجه به شرایط حساس و بحرانی بچه ماهیان در زمان سازش پذیری با آب شور از یک سو و وجود محدودیتهای زیستی بی شمار در بسیاری از رودخانه های عمده محل رهاسازی بچه ماهیان از سوی دیگر، اهمیت پرداختن هرچه بیشتر به وضعیت بچه ماهیان در زمان رهاسازی به رودخانه بسیار احساس می گردد. کاهش میزان دبی آب رودخانه های شمالی کشور، وجود انواع آلاینده های زیستی بیش از حد مجاز در این رودخانه ها، آلودگی و انباشتگی شدید مصبها و مواردی از این قبیل نیز بر وخامت اوضاع می افزایند. از سوی دیگر در چنین شرایطی طبعاً فراوانی غذای طبیعی در رودخانه های محل رهاسازی بچه ماهیان نیز به شکل منفی تحت تاثیر قرار خواهد گرفت. از این رو علاوه بر توجه به محدودیتهای ذکر شده در رودخانه های محل رهاسازی بچه ماهیان سفید، توجه به وضعیت غذای زنده موجود در این رودخانه ها نیز مسئله ای است که متأسفانه تا کنون مورد غفلت قرار گرفته است. نظر به افزایش سطح انرژی مورد نیاز بچه ماهیان گونه های رودکوچ در زمان سازش پذیری با آب شور، وجود غذای کافی و مناسب نقش بسیار مهم و حیاتی در موفقیت بچه ماهیان در سازش پذیری با آب شور خواهد داشت. طبیعتاً سازش پذیری موفق با آب شور بازماندگی بچه ماهیان را در دوره حیات در فاز دریایی به شکل چشمگیری افزایش داده و در نهایت علاوه بر افزایش درصد بازگشت شیلاتی این گونه ارزشمند، می تواند به میزان قابل توجهی به حفظ ذخایر این ماهی در دریای خزر کمک کند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی بوده و با حمایت مالی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان انجام شده است.

## منابع

- Abdolmalaki, SH. 2006. Trends in stocks fluctuation of *Rutilus frisii kutum* in Caspian Sea. Iranian Scientific Fisheries Journal. 15(2): 87-99. (in Persian)
- Amiri, S., Sayad, B.M., Moradi, M., Pourgholami, A. 2008. The effect of water salinity on growth and survival of *Rutilus frisii kutum* fingerlings. Iranian Scientific Fisheries Journal. 17(1): 23-30. (in Persian)
- Ataimehr, B., Mojazi Amiri, B., Mirvaghefi, A., Nezami, SH., Riazi, GH. 2010. Effect of different salinity on ions, osmolarity, water concentration of body tissue, gill chloride cells and mortality percentage of juveniles of caspian roach (*Rutilus frisii kutum* kamensky 1901). 19(2): 115-130. (in Persian)

- Bergmeyer, H.U. 1984. Semi-micro assay for analyzing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in tissue homogenate. In: Methods of enzymatic analysis. 3<sup>rd</sup> edition. Bergmeyer, H.U., Chemie, V. (eds.). Vol. IV. 324 p.
- Bodinier, C., Scure, E., Lecurieux-Belfond, L., Blondeau-Bidet, E., Charmantier, G. 2010. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A (157): 220-228.
- Daborn, K., Cozzi, R., Marshall, W. 2001. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. Journal of Experimental Biology. 204(11): 1889-1899.
- Darvish Bastami, K., Shabani, N., Soltani, F., Afkhami, M. 2011. A survey on ionic and metabolite factors of blood serum in kutum (*Rutilus frisii kutum*). Comparative Clinical Pathology. 21(6): 1193-1195.
- Dean, D.B., Whitlow, Z.W., Borski, R.J. 2003. Glucocorticoid receptor upregulation during seawater adaptation in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). General and Comparative Endocrinology. 132: 112-118.
- 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. Physiological Review. 85: 97-177.
- Febry, R., Lutz, P. 1987. Energy partitioning in fish: the activity related cost of osmoregulation in a euryhaline Cichlid. Journal of Experimental Biology. 128(1): 63-85.
- Foskett, J.F., Logsdon, C.D., Turner, T., Machen, T.E., Bern, H.A. 1981. Differentiation of the chloride extrusion mechanism during seawater adaptation of a teleost fish, the Cichlid *Sarotherodon mossambicus*. Journal of Experimental Biology. 93: 209-224.
- Hiroi, J., McCormick, S.D. 2007. Variation in salinity tolerance, gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$  Cotransporter and mitochondria rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. Journal of Experimental Biology. 210: 1015-1024.
- Hwang, P.P., Lee, T.H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. 148: 479-497.
- Jafari, M., Kamarudin, M.S., Roos saad, C., Arshad, A., Oryan, SH., Bahmani, M. 2009. Development of morphology in hatchery reared *Rutilus frisii kutum* larvae. European Journal of Scientific Research. 38(2): 296-305.
- Juell, J.E., Furevik, D.M., Bjordal, A. 1993. Demand feeding in salmon farming by hydroacoustic feed detection. Aquaculture Engineering. 12: 155-167.
- Jürss, K., Bittorf, T., Vökler, T., Wacke, R. 1983. Influence of nutrition on biochemical sea water adaptation of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 75(4): 713-717.
- Kaneko, T., Watanabe, S., Kyung Mi, L. 2008. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleost. Aquatic Bioscience. 1(1): 1-62.
- Kaushik, S.J., Harache, Y., Luquet, P. 1977. Variation in the total free amino acids level in rainbow trout muscle and blood during its adaptation to sea water. Annals Hydrobiologie. 8: 145-151.
- Kültz, D., Jürss, K. 1991. Acclimation of chloride cells and Na/K-ATPase to energy deficiency in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Journal of Physiology. 95: 39-50.
- Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Del Río, M.P.M., Míguez, J.M., Soengas, J.L., Mancera, J.M. 2003. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. Fish Physiology and Biochemistry. 27(3-4): 179-188.
- Lerner, D.T., Bjornsson, B.T., McCormick, S.D. 2007. Aqueous exposure to 4-nonylphenol and 17 $\beta$ estradiol increases stress sensitivity and disrupts ion regulatory ability of juvenile Atlantic Salmon. Environmental Toxicology and Chemistry. 26(7): 1433-1440.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.
- Madsen, S.S. 1990. Cortisol treatment improves the development of hypoosmoregulatory mechanisms in the euryhaline rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Fish Physiology and Biochemistry. 8: 45- 52.
- Madsen, S.S., Jensen, M.K., Nohr, J., Kristiansen, K. 1995. Expression of Na-K-ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: in vivo modulation by hormones and seawater. American Journal of Physiology. 269: 1339-1345.

- Mancera, J.M., McCormick, S.D. 1999. Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor I and 3,3',5-triiodo-L-thyronine on hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 21: 25-33.
- Martinez-Alvarez, R.M., Sanz, A., Garcia-Gallego, M., Domezain, A., Domezain, J., Carmona, R., Ostos-Garido, M., Morales, A.E. 2005. Adaptive branchial mechanisms in the sturgeon *Acipenser naccarii* during acclimation to saltwater. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 141: 183-190.
- Mazandaran Fisheries, a government agency. 2010. Performance of Shahid Rajaei, reproduction and restocking center. Final project report. 59 p. (in Persian)
- McCormick, S.D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoology*. 41: 781-794.
- Mohiseni, M., Mojazi Amiri, B., Mirvaghefi, A., Farabi, M.V., Riazi, G. 2015. The change of some ion, hormone and biochemical factors in released fingerling of kutum fish (*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901) at the estuarine of Tajan river (Sari). *Journal of Fisheries*. 68(1): 139-155. (in Persian)
- Nance, J.M., Masoni, A., Sola, F., Bornancin, M. 1987. The effects of starvation and sexual maturation on Na<sup>+</sup> transbranchial fluxes following direct transfer from freshwater to seawater in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 87A: 613-622.
- Polakof, S., Arjona, F.J., Sangiao-Alvarellos, S., del Río, M.P.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L. 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Journal of Comparative Physiology*. 176(5): 441-452.
- Pousti, I., Adib Moradi, M. 2000. *Comparative histology*. University of Tehran Press. 531 p. (in Persian)
- Rojo, M.C., Blaquez, M.J., Gonzalez, M.E. 1997. Ultrastructural evidence for apoptosis of pavement cells, chloride cells, and hatching gland cells in the developing branchial area of the trout *Salmo trutta*. *Journal of Zoology*. 243: 637-651.
- Salehi, H. 2008. Comparative economics of Kutum (*Rutilus frisii kutum*) fingerling production and releasing over the 2001-2003 in north of Iran. *Pajouhesh va Sazandegi*. 20(4): 131-140.
- Sangiao-Alvarellos, S., Arjona, F.J., del Río, M.P.M., Míguez, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L. 2005. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Biology*. 208: 4291-4304.
- Stefansson, S.O., Imsland, A.K., Handeland, S.O. 2009. Food-deprivation, compensatory growth and hydro-mineral balance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts in sea water. *Aquaculture*. 290: 243-249.
- Stefansson, S.O., McGinnity, P., Björnsson, B.Th., Schreck, C.B., McCormick, S.D. 2003. The importance of smolt development to salmon conservation, culture, and management. *Perspectives from the 6th International Workshop on Salmonid Smoltification*. *Aquaculture*. 222(1-4): 1-14.
- Tipsmark, C.K., Madsen, S.S. 2001. Rapid modulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in osmoregulatory tissue of a salmonid fish. *The Journal of Experimental Biology*. 204: 701-709.
- Tipsmark, C.K., Madsen, S.S., Seidelin, M., Christensen, A.S., Cutler, C.P., Cramb, G. 2002. Dynamics of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> Cotransporter and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Zoology*. 293: 106-118.
- Uchida, K., Kaneko, T., Tagawa, M., Hirano, T. 1998. Localization of cortisol receptor in branchial chloride cells in chum salmon fry. *General and Comparative Endocrinology*. 109: 175-185.
- Wang, P.J., Lin, C.H., Hwang, L.Y., Huang, C.L., Lee, T.H., Hwang, P.P. 2009. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 152: 544-551.