پاسخ های ساختاری کلیه ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) در سازش با شوری های مختلف محیطی

آسیه میرعالی[۱]، عبدالعلی موحدی نیا[۱و۲*]، رحیم عبدی[۱] و امیرپرویز سلاطی[۲و۳]

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر
۲. پژوهشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۳. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

چکیده

تعادل آب و الکترولیت‌ها در محیط‌های هایپراسمتیک دریایی و هایپواسمتیک برای موجودات آبزی اهمیت حیاتی دارد. کلیه‌ها به عنوان یکی از اندام‌های دفعی نقش مهمی در تنظیم اسمزی و حفظ و نگه‌داری هومئوستازی مایعات بدن ایفا می‌کند. در این مطالعه اثر اعمال شوری‌های مختلف بر تغییرات ساختار کلیه در ماهی صبیتی *Sparidentex hasta* مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه با ۴ تیمار و سه تکرار انجام شد. در هر تانک تکرار ۱۵ عدد ماهی در مخازن پلی اتیلن ۳۰۰ لیتری قرار داده شده بود و دوره آزمایشی مواجهه با شوری های مختلف به مدت ۱۴ روز به طول انجامید. تیمارها شامل شوری های ۵، ۲۰، ۶۰ گرم در لیتر و شوری کنترل (۴۰گرم در لیتر) بودند. نتایج مطالعه تغییرات در قسمت میانی کلیه، قطر لومن توبول پروکسیمال ابتدایی در ۲۴ ساعت اول قرارگیری در شوری ۵ و ۲۰ گرم در لیتر افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). قطر لومن توبول پروکسیمال در قسمت دوم در طی سازش با شوری‌های مختلف در طول دوره نمونه‌برداری تغییر معنی‌داری را نشان نداد ($P>۰/۰۵$). قطر لومن توبول دیستال در قسمت میانی کلیه در تیمار ۶۰ گرم در لیتر در روز دوم آزمایش افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). همچنین در شوری‌های ۵ و ۴۰ گرم در لیتر در ۲۴ ساعت اول اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بررسی ضخامت دیواره قسمت‌های مختلف لوله‌ی ادراری در قسمت میانی و انتهایی کلیه اختلاف معنی-داری نشان نداد($P>۰/۰۵$). بر اساس نتایج به دست آمده، تغییرات در ساختار بافتی کلیه طی ۴۸-۲۴ ساعت پس از استرس وارد شده به حالت پایه بازمی‌گردد، که نشان دهنده‌ی غلبه ماهی بر استرس محیطی وارد شده است.

واژگان کلیدی: تنظیم اسمزی، کلیه، استرس، فیزیولوژی، بافت شناسی

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: amovahedinia@yahoo.com

۱. مقدمه

درموجودات آبزی به دلیل زندگی در محیط آبی که ممکن است از فشار اسمزی یا مایعات داخلی متفاوت باشد، تعادل آب و الکترولیت‌ها در مقایسه با موجودات خشکی زی دارای اهمیت بیشتری است. ماهی‌ها در محیطهای آبی از آب تقریبا خالص تا محیط‌های با شوری بسیار بالا یافت می‌شوند(Flik and Verbost, 1993). از این رو مکانیسم‌های تنظیم اسمزی در گونه‌های مختلف متناسب با محیط زندگی می‌باشد. 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(Stewart Fielder *et al*., 2007).بعضی گونه‌ها زندگی خود را در محیطی می‌گذرانند که شوری آن محیط می‌تواند ثابت یا متغیر باشد در حالی که برخی گونه‌ها برای تولید مثل به محیط دیگری غیر از محل زندگی خود مهاجرت می‌کنند. تنظیم‌اسمزی، مکانیسم حفظ هومئوستازی مایعات درونی بدن است که مسئول کنترل اسمولالیته یا فشار اسمزی پلاسما می‌باشد (Varsamos *et al*., 2005). توانایی ماهی‌ها در مقابله با شوری به ظرفیت آنها در تنظیم اسمزی وابسته است، عملکردی که به تحمل سطوح معین شوری و در نهایت بقای ماهی در محیط های مختلف منجر می‌گردد. کلیه یکی از اندام هایی است که در تنظیم اسمزی موثر می باشد. کلیه بسیاری از ماهیان، اندامی باریک، طویل و به رنگ قرمز تیره است,که در امتداد ناحیه‌ی پشتی دیواره‌ی بدن، درست در زیر ستون مهره‌ها کشیده شده است. واحدهای ترشحی ادرار یا نفروندر کلیه ماهی‌های استخوانی حقیقی، به قسمت‌های زیرشامل گلومرول ،کپسول بومن ،مجاری کلیوی(لوله‌های ادراری)،بخشگردنی،لوله‌هاپیچیده نزدیک شامل قسمت اول[1] (PI) و قسمت دوم[2] (PII) ،لوله‌های میانی، لوله‌های پیچیده دورتقسیم می شود(Charmi *et al* ., 2010).

لوله های پیچیده نزدیک در *قسمت* PI لوله‌ها دارای سلول‌های پوششی مکعبی مژه‌دار هستند و رأس سطح آنها دارای میکروکرک‌های[3] متراکم است. این میکروکرک‌ها با میکروسکوپ نوری با حاشیه مسواکی قابل مشاهده هستند. هسته این سلول‌ها بزرگ و کروی یا بیضی شکل است، که در مرکز یا راس سلول قرار دارند. سیتوپلاسم آنها دارای میتوکندری زیاد و دانه‌های ترشحی می‌باشد. لوله‌های پیچیده ادراری در قسمت PII شامل سلول‌های مکعبی می‌باشند. در این سلول‌ها نیز مژه و میکروکرک‌ها در فضای داخلی لوله مشخص هستند. قطر لوله‌ها و دهانه آنها مانند PI است ولیکن گاهی دارای فضای گشادتری می‌باشند. سلول‌های پوششی در لوله‌های پیچیدهٔ دور، دارای میتوکندری فراوان با میکروکرک‌های کوتاه وپراکنده هستند هرچند که حاشیه مسواکی در آنها با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده نیست، اما این دو بخش با استفاده از میکروسکوپ نوری قابل تشخیص هستند. توبول های دیستال دارای سلول های مکعبی بوده و هسته ی آنها گرد و در وسط سلول قرار گرفته است. عدم وجود حاشیه ی مسواکی روی سطح رأسی سلول های اپیتلیال وجه تمایز این بخش با قسمت پروکسیمال می باشد(Charmi *et al* ., 2010).

۲. مواد و روش ها

برای انجام پروژه از ۱۸۰ عدد ماهی صبیتی *Sparidentx hasta*در محدوده وزنی ۱۵۰گرم و طول حدود ۲۰ الی ۲۵ سانتی‌متر، حاصل از تکثیر مولدین در ایستگاه تحقیقاتی بندر امام خمینی (ره) استفاده شد. ماهی‌ها در تانک‌های ۱۵۰۰ لیتری محتوی آب دریای فیلتر و تیمار شده با اشعه ماورای بنفش نگه-داری می‌شدند. ماهی‌های صبیتی برای انجام پروژه به

1. Primery Proximal Convoluted Tubule
2. Secondry Proximal Convoluted Tubule
3. Microvili

صورت تصادفی در ۱۲ تانک ۳۰۰ لیتری (۱۵عدد ماهی در هر تانک) توزیع شدند. شرایط محیطی شامل دما، نور، pHو اکسیژن محلول در طول پروژه برای تمامی تانک‌ها یکنواخت بود(جدول۱).

جدول ۱. فاکتورهای محیطی ثبت شده

اکسیژن	pH	دما	شوری
۶-۶/۸ میلی گرم در لیتر	۷/۸-۸/۳	۱۹-۲۱ سانتی گراد	درحد تعیین شده

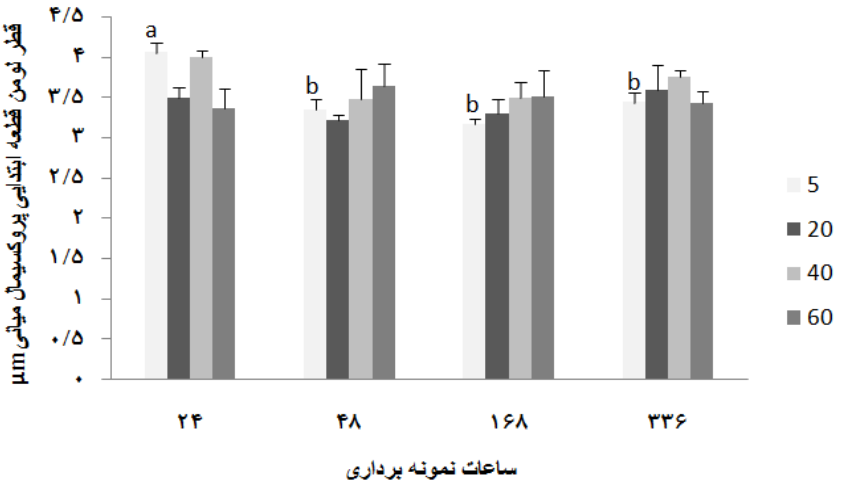
شوری‌های مورد آزمایش ۵، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ گرم در لیتر بودند و برای هر شوری سه تانک تکرار در نظر گرفته شد. برای تهیه شوری ۵و ۲۰ گرم در لیتر به آب دریا آب شیرین اضافه شد تا زمانی که شوری به مقدار مورد نظر برسد برای شوری ۴۰ گرم در لیتر از آب دریا استفاده شد و برای تهیه شوری ۶۰ گرم در لیتر به آب دریا نمک دریا افزوده می‌شد.طول دوره آزمایش ۱۴ روز برای بررسی تغییرات بافتی کلیه ماهی طراحی شد و پس از یک هفته سازگاری ماهی به تانک‌هایی با شوری مشخص انتقال داده شدند. نمونه‌برداری از ماهیان در ۶ مرحله در ساعت ۶، ساعت ۱۲، روز ۱، روز ۲، روز۷ و روز۱۴ ، بصورت همزمان و ۱ماهی از هر تانک (۳ماهی از هر تیمار) در هر بار نمونه‌برداری انجام شد. ماهیان پس از صید، بلافاصله جهت کاهش اثرات عوامل استرس‌زا،درداخل ظرف های پلاستیکی محتوی آب همسان باتانک حاوی هر ماهی که دارای ماده بیهوش‌کننده گل-میخک بود، بیهوش شدند. برای تهیه نمونه بافتی حفره شکمی باز و کلیه‌ها به صورت کامل از بدن جدا شدند. پس از جداسازی کلیه‌ها نمونه‌ها را بمدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن (۷۵ میلی‌لیتر محلول اسید پیکریک اشباع، ۲۵ میلی‌لیترفرمالدهید۳۷٪ و ۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال) تثبیت کرده و تا زمان انجام مراحل بعدی بافت‌شناسی، در الکل ۷۰٪ نگه‌داری شدند(Movahedinia *et al.*, 2009). جهت مقایسه میانگین تغییرات مورفومتریک توبول‌های کلیوی در شوری‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در نرم افزار SPSS 11.5 و از پس آزمون Tukey جهت بررسی دو به دوی داده‌ها استفاده شد. اختلاف در سطح اطمینان بالاتر ۹۵٪، مورد پذیرش قرار گرفت.

۳. نتایج

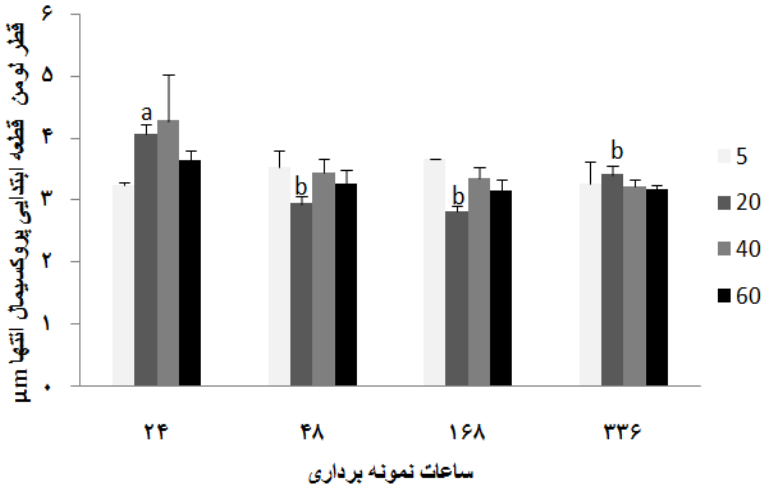
در بررسی قطر لومن در قطعه اول توبول‌های پروکسیمال در قسمت میانی کلیه، پس از ۲۴ ساعت قرار گیری ماهی در معرض شوری۵ گرم در لیتر افزایش معنی‌داری به وجود آمد که در نمونه‌برداری-های بعد به مقادیر مشاهده شده در سایر تیمارها ونمونه‌های کنترل برگشت(شکل ۱). بر اساس نتایج بیشترین و کمترین قطر لومن به ترتیب۰/۱۳ ±μm ۴/۰۶ و۰/۲۵ ±۳/۳۷ μm به ترتیب در شوری‌های ۶۰ و ۵گرم در لیتر در روز اول محاسبه شد. در سازگاری با سایر شوری‌ها تغییر معنی‌داری طی زمان‌های نمونه‌گیری مشاهده نشد. پس از مواجهه با شوری‌های مختلف محیطی قطر لومن در قسمت ابتدایی توبول-های پروکسیمال در بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از قسمت انتهایی کلیه، تنها در شوری ۲۰ گرم در لیتر تغییرات معنی‌داری رخ داد. بدینصورت که ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری۲۰ گرم در لیتر قطر لومن افزایش یافت اما در ادامه مقادیر به حالت مشابه با نمونه‌های کنترل و سایر شوری‌ها بازگشت(شکل ۲). نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین قطر لومن به ترتیب۰/۷۵ ±۴/۲۸ μm و ۰/۰۹ ±۲/۸۳ μm در شوری۲۰ گرم در لیتر در روز هفتم نمونه برداری و شوری کنترل در ساعت ۲۴ بود. در بررسی‌مقاطع بافتی تهیه شده از قسمت‌های میانی و انتهایی کلیه

طی سازش با شوری‌های مختلف در طول دوره نمونه-برداری در قطر لومن قسمت دوم توبول پروکسیمال تغییر معنی داری مشاهده نشد.

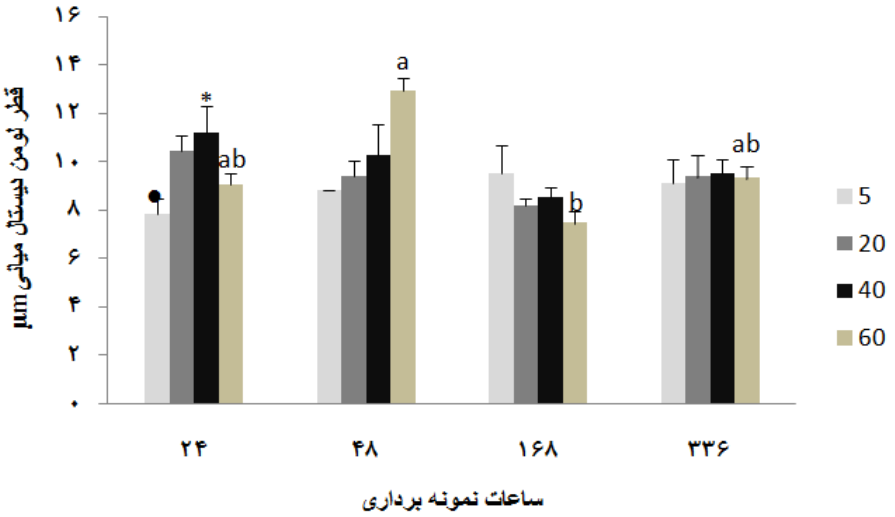
بررسی توبول‌های دیستال در شوری‌های مختلف در طول دوره نمونه‌برداری در شوری ۶۰ گرم در لیتر در روز دوم افزایش معنی‌داری را نشان داد که این در روز هفتم کاهش و به مقادیر نمونه‌های کنترل برگشت(شکل۳). در سایر شوری‌های مورد بررسی اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در بررسی زمان-های مختلف نمونه‌برداری پس از ۲۴ ساعت بین شوری ۵ و ۴۰ گرم در لیتراختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۳). در بررسی سایر زمان‌های نمونه‌برداری بین شوری‌های متفاوت اختلاف معنی-داری مشاهده نشد. در بررسی توبول‌های دیستال قسمت انتهایی کلیه ماهی صبیتی در شوری‌های مختلف در طول دوره نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در بررسی ضخامت دیواره قسمت اول توبول پروکسیمال، دیواره قسمت دوم پروکسیمال ودیواره توبول دیستال در قسمت میانی و انتهای کلیه تغییر معنی‌داری در پاسخ به شوری‌های مختلف در زمان‌های متفاوت نمونه برداری مشاهده نشد.



شکل۱. مقایسه مقادیر قطر لومن قسمت ابتدایی پروکسیمال در قسمت میانی کلیه ماهی صبیتی طی سازش باشوری‌ها مختلف. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف نمونه‌گیری در هر شوری می‌باشد.



شکل۲. مقایسه مقادیر قطر لومن بخش اول پروکسیمال در قسمت انتهایی کلیه ماهی صبیتی طی سازش باشوری‌های مختلف. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها مختلف در هر شوری می‌باشد.



شکل۳. مقایسه مقادیرقطر لومن توبول دیستال در کلیه ماهی صبیتی در طی سازش با شوری‌های مختلف.حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در هر شوری می‌باشد.

۴. بحث و نتیجه گیری

کلیه‌ها نقش مهمی را در تنظیم اسمزی ماهی صبیتی به عنوان یک ماهی استخوانی یوری هالین به نمایش می‌گذارد و با تغییر در میزان جریان ادرار و کنترل تعادل میان ترشح و بازجذب یون‌ها در شوری-های مختلف محیطی در نگه‌داری هومئوستاز بدن آبزیان موثر است (Dantzler, 2003). تغییرات اساسی در ساختار بافتی کلیه ماهیان یوری هالین طی سازگاری هنگام جابه‌جایی بین آب‌های شور وشیرین، صورت می‌گیرد.در بررسی کلیه ماهی صبیتی مشخص شد که قطر لومن در توبول‌های پروکسیمال I در قسمت میانی کلیه در شوری ۵گرم در لیتر، ۲۴ساعت پس از تغییر شوری محیطی افزایش یافت که در روزهای بعد به حالت عادی ونزدیک به نمونه-های کنترل برگشت. چنین اختلافی در قطعه I پروکسیمال در بخش انتهایی کلیه در شوری۲۰ppt

مشاهده شد بدین صورت که قطر لومن در بخش انتهایی کلیه ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری‌ها افزایش نشان داد که بلافاصله در روزهای بعدی به حالت عادی برگشت. این افزایش قطر احتمالا می-تواند به علت ورود ماهی به محیط هایپواسمتیک و ورود حجم بالای آب و کشیدگی بیشتر لومن اتفاق افتاده باشد (Charmi *et al.*, 2010). که احتمالا به تدریج با فعال شدن مکانیسم‌های مختلف تنظیم اسمزی مثل تغییر در نفوذپذیری پوست،کاهش در میزان آب نوشیده شده، برداشت فعال یون‌ها در حفره آبششی و همچنین افزایش سرعت جریان فیلتراسیون در نفرون‌ها و تغییر در تعداد نفرون‌های تصفیه‌کننده موجب می‌شود که قطر لومن در بخش پروکسیمال به حالت عادی برگردد. مورفولوژی لوله‌های کلیوی به طور سریع و شگفت‌آوری برای سازگاری با شرایط هایپواسمتیک تغییر می‌کند، تغییرات ساختاری و بافتی در شرایط اسمزی مختلف پروسه‌های آرام و تدریجی نیست (Wong and Woo, 2006).). در بررسی که بر روی ماهی آب شیرین *Etroplusmaculates* انجام شد با قرار گرفتن تدریجی در آب دارای شوری ۳۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰درصد آب دریا در بافت کلیه ماهی کاهش معنی‌داری در قطر لومن مشاهده شد که علت آن را کاهش میزان فیلتراسیون کلیوی بیان کردند در ادامه سازگاری ماهی با سایر شوری‌ها، قطر لومن به مقادیر اندازه‌گیری شده در آب شیرین بازگشت (Virabharachari, 1961). قطر لومن در قسمت II پروکسیمال در قسمت میانی و انتهایی کلیه تغییر نکرد که علت این امرممکن است به دلیل بلندتر بودن سلولهای ستونی اپیتلیال pII از pI باشد (Elger *et al.*, 2000). قطر لومن توبول دیستال در قسمت میانی کلیه روز دوم پس از مواجهه با شوری ۶۰ گرم در لیتر افزایش نشان داد و در طی سازگاری به مقادیر اولیه و کنترل برگشت. که این افزایش احتمالا به علت نیازماهی به دفع یون بواسطه عملکرد این مجاری، کاهش در میزان فیلتراسیون گلومرولی و افزایش در جذب آب در توبول‌های دیستال و توبول‌های جمع کننده اداری است. در بخش میانی کلیه قطر لومن توبول دیستال در شوری ۵ گرم در لیتر در روز اول نمونه برداری پس از مواجهه با محیط هایپواسمتیک نسبت به نمونه‌های کنترل کاهش معنی‌داری را داشت در حالیکه در زمان‌های بعدی نمونه گیری تفاوت معنی‌داری بین قطر لومن در بخش دیستال کلیه در ماهیان سازش یافته در تمامی شوری‌ها مورد مطالعه مشاهده نشد.علت این تغییر در بافت کلیه ماهی احتمالا کاهش نفوذپذیری به آب و از طرفی افزایش جذب یون‌ها و کاهش شدید در دفع نمک در این ناحیه از توبول‌های کلیوی می‌باشد(Evans *etal*., 1993).

در بررسی ضخامت دیواره توبول‌های کلیوی در تمامی بخش‌ها در شوری‌های مختلف طی دوره آزمایش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد دلیل این عدم تغییر احتمالا به علت تغییر در تعداد توبول‌های کلیوی در بافت کلیه ماهی می‌باشد. بررسی هیستومتریک مجاری جمع‌کننده اداری بر روی ماهی کپور معمولی تعداد لوله‌ها ی جمع‌کننده در پاسخ به شوری‌های مختلف تغییر یافت اما در ضخامت دیواره و قطر لومن داخلی این توبول‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (عزیزی،۱۳۸۷). در بررسی سازگاری ماهی زروکباشوری‌های ۵،۱۰،۲۰،۳۰ppt نیز عدم تغییر در ضخامت دیواره توبول‌های کلیوی گزارش شده است(چناری ،۱۳۸۷). در بررسی شاخص‌های بافتی ماهی صبیتی در طی انتقال به شوری‌های مختلف مشخص شد،که ماهی صبیتی می‌تواندعلاوه بر تحمل شوری‌های بالاتر و پایین‌تر از آب دریا وحتی محیط با شوری۵ گرم در لیتر به خوبی خود را با زندگی در این محیط‌ها سازگار نماید. در قسمت هایی از نفرون بعنوان واحد عملکردی کلیه تغییراتی سریع رخ داد که این تغییرات نیز موقت بودو طی دو الی هفت روز به حالت عادی بازگشت. این نتایج نشان دهنده آن است که کلیه با ایجاد تغییرات ساختاری سریع طی ۲۴ الی

۴۸ ساعت اولیه اعمال شوری‌های جدید با استرس ورد شده مقابله نموده و همزمان در پروسه‌های طولانی‌تر تغییرات عملکردی در بخش‌های مختلف آن رخ می‌دهد و جایگزین پاسخ‌های ساختاری می‌گردد.

قدردانی

مقاله حاضر در قالب پایان‌نامه مصوب دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و با حمایت‌ها و کمک-های پژوهشکده علوم دریایی، پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب و ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره)، به انجام رسیده است. لذا نویسندگان از متخصصان و پرسنل مرتبط به ویژه آقایان دکتر مرمضی، دکتر اسکندری، مهندس نجف‌آبادی و مهندس محمدرضا صحرائیان تشکر و قدردانی می-نمایند.

منابع

چناری، ف. ۱۳۸۷.مطالعه تغییرات بافتی در کلیه ماهی زروک *Scatophagus argus* در پاسخ به شوری‌های مختلف، پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیولوژی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.

عزیزی، ش.، ۱۳۸۷. تأثیر درجات مختلف شوری بر تغییرات بافتی آبشش و کلیه ی کپور معمولی *Cyprinus carpio*، پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی شیلات، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.

Charmi, A., Parto, P., Bahmani, M., Kazemi, R. 2010. Morphological and Histological Study of Kidney in Juvenile Great Sturgeon (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Asipenserpersicus*). J. Agr. Environ. Sci. 7: 505-511.

Dantzler, W.H. 2003. Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium chloride and organic anion. Comp. Biochem. Physiol. 136: 453-478.

Elger, M., Hentschel, H., Dawson, M., Renfro, J.L. 2000. Urinary tract. In: G.K. Ostrander, editor. The laboratory fish. Academic Press, p 385- 413.

Evans,D.H. 1993. Osmotic and ionic regulation. In:The physiology offishes., D.H.Evans (Ed.). Academic press, p 315–342.

Flik, G. and Verbost, P.M., 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. Exp. Biol. 184: 17–29.

Movahedinia, A.A., Savari, A., Morovvati, H., kochanian, P., Marammazi,J.G., N afisi, M. 2009. The Effects of Changes in Salinity on Gill Mitochondria Rich Cells of Juvenile Yellofin Seabream ,*Acanthopagrus latus*. J. Biol. Sci. 9: 710-720

Stewart Fielder, D., Allan, G.L., 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

Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G. 2005. Ontogeny of osmoregulation in post-embryonic fish. J. Com. Biochem. Physiol. 141: 401-429.

Virabadrachari, V. 1961. Structural changes in gills, intestine, and kidney Etroplus maculates adapted to different salinities. Q. J. Microsc. Sci. 102: 361-369.

Wong, M.K.S., Woo, N.Y.S. 2006. changes in renal morphometrics in silver sea bream (*Sparus sarba*) on exposure to different salinities.J. Fish. Biol. 69: 770-782.