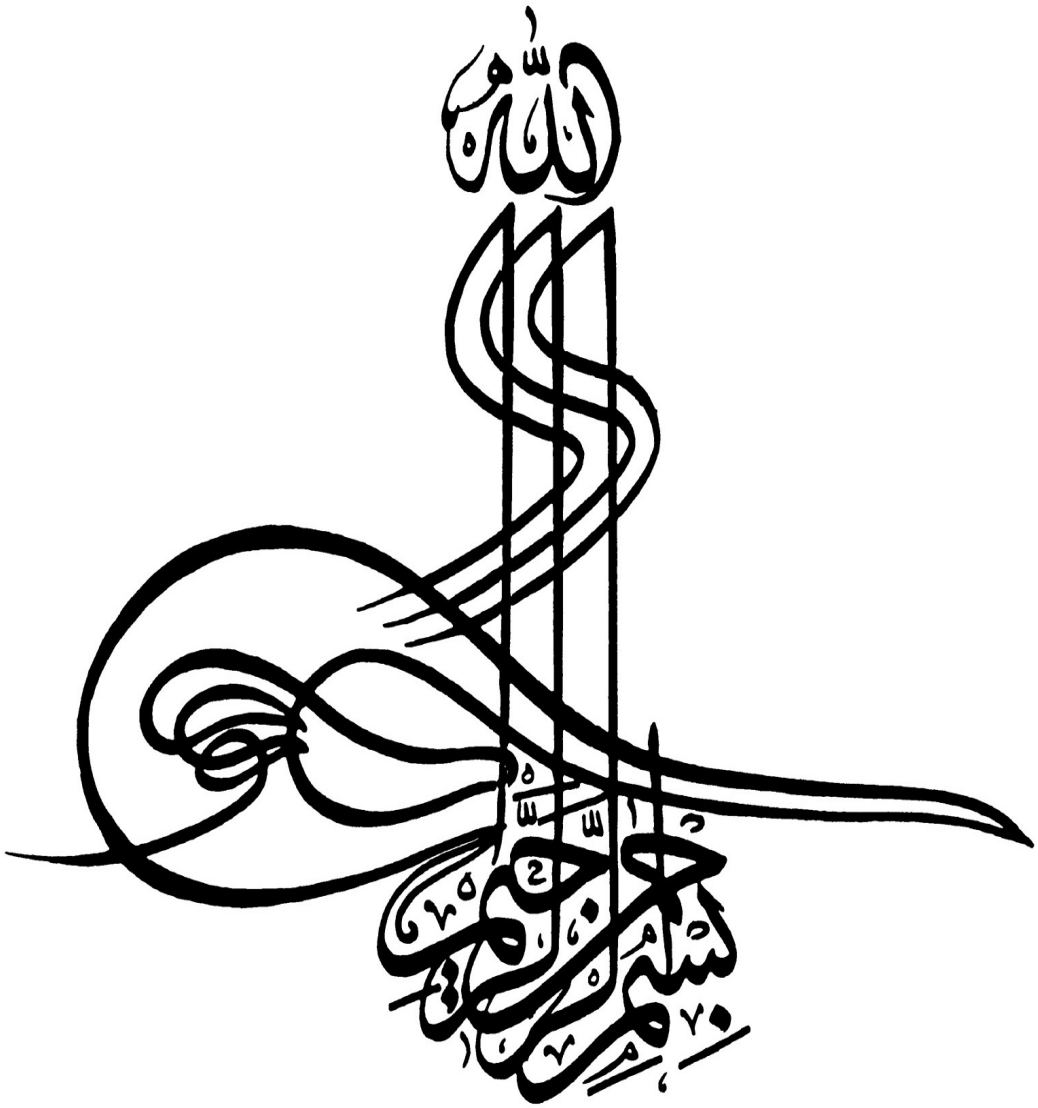

الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی

گروه بیولوژی دریا

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی علوم جانوری گرایش بافت شناسی آبزیان

مکان یابی آنزیم Na^{+}, K^{+}- ATPase و مطالعه ی تغییرات فیزیولوژیک در سلول های غنی از میتوکندری توبول های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی *(Epinephelus coioides)* طی روند سازگاری با شوری های مختلف

اساتید راهنما:

دکتر حسین ذوالقرنین

دکتر رحیم عبدی

اساتید مشاور:

دکتر حسن مروتی

پروفسور احمد سواری

پژوهشگر:

احسان رومیانی

مهر ماه ۱۳۹۰

بسم الله الرحمن الرحیم

تقدیم به ساحت مقدس حضرت ولی عصر(عج)، روح بلند و ملکوتی حضرت امام(ره)، مقام معظم رهبری(مدظله العالی) و شهدای راه علم و دانش این مرز و بوم: شهریاری، علی محمدی و احمدی روشن...

امیدوارم با انجام این پروژه گامی هرچند کوچک در راه پیشرفت و اعتلای ایران اسلامی برداشته باشم...

اما انجام این پروژه جز با همکاری همه جانبه ی اساتید محترم راهنما و مشاور و بطور اخص جناب آقای دکتر رحیم عبدی، حمایت همیشگی خانواده ی عزیزم و دوستان گرانقدرم آقایان جمشید امیری مقدم، محمدرضا پورخواجه، محمدرضا صحرائیان، محمدرضا سامانی، سعید کشتکار، غلامرضا حیات داودی، نیمایزدی، علی لیراوی، امید کوهکن، غلامرضا قاعدی، حسین مرادیان و ... و خانم ها معصومه فرهاد، معصومه داراب پور، رحیمه دربه، لیلا حسنی نژاد ممکن و میسر نبود. از این دوستان و سایر عزیزانی که در انجام این پروژه بنده را یاری رساندند کمال تقدیر و تشکر را دارم.

نام: احسان	**نام خانوادگی:** رومیانی
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد	**رشته و گرایش:** علوم جانوری - بافت شناسی آبزیان
اساتید راهنما: دکتر حسین ذوالقرنین و دکتر رحیم عبدی	**اساتید مشاور:** دکتر حسن مروتی و پروفسور احمد سواری

تاریخ دفاع: مهر ماه ۱۳۹۰

کلید واژه ها: تنظیم اسمزی، آنزیم Na^+, K^+- ATPase، مکان یابی ایمنیایی، میتوکندری، نفرون های کلیه، ماهی هامور معمولی، *Epinephelus coioides*

مکان یابی آنزیم Na^+, K^+- ATPase و مطالعه ی تغییرات فیزیولوژیک در سلول های غنی از میتوکندری توبول های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی *(Epinephelus coioides)* طی روند سازگاری با شوری های مختلف

چکیده:

با توجه به نقش اندام های دفعی در حفظ هومئوستازی و نیز ارتباط مستقیم آنها با توانایی تنظیم اسمزی ماهیان، در این تحقیق علاوه بر مطالعه ساختار بافتی نفرون های کلیوی و فراساختار توبول ها به بررسی اثر تغییرات شوری محیطی بر روی چگونگی توزیع آنزیم Na^+, K^+- ATPase و اندامک میتوکندری و همچنین تغییر در فراوانی این اندامک در سلول های غنی از میتوکندری توبول های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی *(Epinephelus coioides)* پرداخته شد. برای این منظور، ۶۴۰ قطعه بچه ماهی هامور معمولی با میانگین وزنی ۷/ ± ۴ گرم و طول متوسط ۵/ ± ۴ سانتی متر از مرکز تحقیقات شیلات واحد بندر امام خمینی (ره) و ماهشهر تهیه شد. ماهیان به مدت یک هفته برای سازگاری با شرایط جدید نگهداری شده و در طول این مدت و نیز طول دوره ی آزمایش با استفاده از غذای تجاری بیومار تغذیه شدند. پس از آن، ماهیان بتدریج به ۱۶ تانک ۳۰۰ لیتری محتوی آب با شوری های مختلف (ppt ۶۰ و ۴۰، ۲۰، ۱۰) و هر تانک ۴۰ قطعه بچه ماهی منتقل شدند. تیمار ppt ۴۰ بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. در این تحقیق به منظور مطالعه ی ساختار نفرون ها و فراساختار توبول ها، بررسی نحوه ی توزیع آنزیم Na^+, K^+- ATPase، بررسی نحوه ی توزیع میتوکندری ها و مطالعه ی تغییرات فراوانی میتوکندری ها در سلول های غنی از میتوکندری توبول های کلیه نمونه گیری بعمل آمد. برای انجام مطالعات میکروسکپ نوری از رنگ آمیزی های PAS و H&E، برای بررسی نحوه ی توزیع و پراکندگی آنزیم Na^+, K^+- ATPase از روش مکان یابی ایمنیایی این آنزیم و در نهایت به منظور مطالعه ی فراساختار توبول ها، نحوه ی توزیع میتوکندری ها و تغییر در فراوانی آنها از میکروسکپ الکترونی گذاره (TEM) استفاده شد.

نتایج مطالعات بافت شناسی معمولی نشان دهنده ی حضور گلومرول، قطعه ی گردنی و توبول های پروکسیمال، دیستال و جمع کننده در ساختار نفرون های کلیوی بچه ماهی هامور بود. نتایج رنگ آمیزی PAS که به منظور تمیز دادن نقاط دارای حاشیه ی مسواکی از سایر نواحی استفاده شد، نشان داد که بجز توبول پروکسیمال (I & II) در لومن بقیه ی توبول ها حاشیه ی مسواکی ای حضور ندارد. مکان یابی ایمنیای آنزیم Na^{+}, K^{+}- ATPase نشان داد که این آنزیم در سمت قاعده ای جانبی غشاء سلولی سلول های اپیتلیال توبول ها با تمرکز بیشتر و در سیتوپلاسم این سلول ها به میزان کمتری حضور دارد اما در ساختار گلومرول ها حضور ندارد. نتیجه ی فوق علاوه بر تیمار کنترل در مورد تیمار های مختلف شوری نیز صادق بود. استفاده از میکروسکپ الکترونی گذاره به منظور بررسی چگونگی پراکندگی میتوکندری ها و تغییرات فراوانی آنها نشان داد که میتوکندری ها در همه تیمار ها (بجز تیمار شاهد) از روز اول دوره آزمایش به سمت روز آخر دوره (روز هفتم)، از نقاط مختلف سلول به سمت غشاء قاعده ای - جانبی سلول حرکت کرده و در روز آخر در این ناحیه از غشاء متمرکز شده اند. فراوانی میتوکندری ها نیز طی این دوره ی آزمایش دچار تغییراتی شد که نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین میانگین فراوانی میتوکندری ها در روز اول با میانگین فراوانی آنها در روز دوم و هفتم همه ی تیمار ها باستثنای تیمار کنترل بود. اما میانگین فراوانی میتوکندری ها در روز های دوم و هفتم تمام تیمار ها اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P <$ ۰/۰۵). همچنین نتایج مقایسه ی میانگین فراوانی میتوکندری ها در روز اول، دوم و هفتم همه ی تیمار ها نسبت به تیمار کنترل و نسبت به هم نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین میانگین های بدست آمده در روز های اول، دوم و هفتم تیمار های سه گانه با تیمار کنترل و همچنین نسبت به هم بود ($P <$ ۰/۰۵).

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه و کلیات ۱

۱-۱- مقدمه ۱
۱-۱-۱- ضرورت انجام تحقیق ۴
۱-۱-۲- فرضیه های تحقیق ۵
۱-۱-۳- اهداف تحقیق ۵
۱-۲- کلیات ۵
۱-۲-۱- بیولوژی ماهی هامور ۶
۱-۳-۲- رده بندی هامور ماهیان ۷
۱-۲-۳- تنظیم اسمزی و اندام های دخیل در آن ۸
۱-۲-۳-۱- تنظیم اسمزی ۸
۱-۲-۳-۲- مکانیسم های تنظیم اسمزی در ماهیان آب شیرین و شور ۹
۱-۲-۳-۳- اندام های مهم تنظیم اسمزی ۱۰
۱-۲-۳-۳-۱- آبشش ۱۰
۱-۲-۳-۳-۲- کلیه ۱۱
۱-۲-۳-۳-۳- بخش روده ای- معده ای ۱۱
۱-۲-۳-۳-۴- غدد راست روده ای الاسموبرانش ها ۱۲
۱-۲-۳-۳-۵- پوست و غشای سرپوش آبششی ۱۳
۱-۲-۳-۳-۶- مثانه ی ادراری ۱۳
۱-۲- ۴- روش های تنظیم اسمزی در ماهیان ۱۴
۱-۲- ۵- دستگاه ادراری ۱۷
۱-۲- ۵-۱- آناتومی و مورفولوژی کلیه ماهیان ۱۸
۱-۲- ۵-۱-۱- آناتومی کلیه ۱۸
۱-۲- ۵-۱-۲- بافت شناسی کلیه ۲۱
۱-۲- ۶- عملکرد کلیه های بدون گلومرول و گلومرول دار ۲۳
۱-۲- ۷- کلیه در ماهیان استخوانی دریایی ۲۳
۱-۲- ۷-۱- کلیاتی درباره ساختار بافت شناسی بخش دفعی کلیه ۲۴
۱-۲-۸- ایمونوهیستوشیمی ۲۵
۱-۲-۸-۱- مقدمه ای بر ایمونوهیستوشیمی ۲۵
۱-۲-۸-۲- مراحل حساس در ایمونوهیستوشیمی: آنتی بادی ها و فیکساسیون ۲۵

۱-۲-۸-۲-۱- آنتی بادی ها ۲۵
۱-۲-۸-۲-۱- فیکساسیون ۲۶
۱-۲-۹- سلول های غنی از میتوکندری و آنزیم Na^+, K^+-ATPase ۲۷
۱-۲-۱۰- میتوکندری ها ۲۹
۱-۲-۱۱- سابقه ی تحقیق ۳۰
۱-۲-۱۱-۱- سابقه ی تحقیق در سایر کشورها ۳۰
۱-۲-۱۱-۲- سابقه ی تحقیق در داخل کشور ۳۱

فصل دوم، مواد و روش کار ۳۳

۲-۱- محل و زمان انجام تحقیق ۳۳
۲-۲- نگهداری و سازگاری ماهیان ۳۳
۲-۳- نمونه گیری ۳۵
۲-۴- بافت شناسی کلاسیک و هیستوشیمی ۳۵
۲-۴-۱- مراحل مختلف تهیه ی نمونه ی بافت شناسی ۳۵
۲-۴-۱-۱- نمونه برداری ۳۵
۲-۴-۱-۲- تثبیت کردن (فیکساسیون) ۳۶
۲-۴-۱-۳- شستشوی ماده تثبیت کننده ۳۶
۲-۴-۱-۴- آبگیری ۳۶
۲-۴-۱-۵- شفاف کردن ۳۶
۲-۴-۱-۶- آغشتگی به پارافین ۳۷
۲-۴-۱-۷- قالب گیری (بلوک کردن) ۳۸
۲-۴-۱-۸- برش گیری با میکروتوم ۳۸
۲-۴-۲- رنگ آمیزی ۳۹
۲-۴-۲-۱- رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین ۳۹
۲-۴-۲-۲- رنگ آمیزی PAS ۴۰
۲-۵- آماده سازی نمونه ها برای ایمونوهیستوشیمی و روش کار آن ۴۰
۲-۶- آماده سازی نمونه جهت میکروسکوپ الکترونی ۴۲
۲-۶-۱- ثبوت اولیه ۴۲
۲-۶-۲- شستشو ۴۲
۲-۶-۳- ثبوت ثانویه ۴۲
۲-۶-۴- شستشو ۴۲
۲-۶-۵- آبگیری ۴۲

۲-۶-۶- آغشتگی با رزین ۴۳
۲-۶-۷- قالب گیری ۴۳
۲-۶-۸- پلیمریزاسیون ۴۳
۲-۶-۹- تهیه برش های فوق نازک ۴۳
۲-۶-۱۰- رنگ آمیزی برش های فوق نازک ۴۴
۲-۷- روش های آماری و نرم افزارهای مورد استفاده ۴۵

فصل سوم، نتایج ۴۶

۳-۱- مطالعات بافت شناسی ۴۶
۳-۱-۱- رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و PAS ۴۶
۳-۲- نتایج مطالعات فراساختاری توبول های کلیوی ۵۱
۳-۳- مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی ۵۶
۳-۳-۱- نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمی در شوری ۱۰ ppt ۵۶
۳-۳-۲- نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمی در شوری ۲۰ ppt ۵۷
۳-۳-۳- نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمی در شوری ۴۰ ppt ۵۷
۳-۴-۴- نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمی در شوری ۶۰ ppt ۵۸
۳-۴- نتایج بررسی های میکروسکپ الکترونی گذاره ۵۹
۳-۴-۱- ریخت شناسی میتوکندری ها ۵۹
۳-۴-۲- بررسی اثر تغییرات شوری روی نحوه ی توزیع میتوکندری ها ۶۰
۳-۴-۲-۱- نحوه ی توزیع میتوکندری ها در شوری ۱۰ ppt ۶۰
۳-۴-۲-۲- نحوه ی توزیع میتوکندری ها در شوری ۲۰ ppt ۶۱
۳-۴-۲-۳- نحوه ی توزیع میتوکندری ها در شوری ۴۰ ppt ۶۲
۳-۴-۲-۴- نحوه ی توزیع میتوکندری ها در شوری ۶۰ ppt ۶۴
۳-۴-۳- مقایسه ی میانگین تعداد میتوکندری ها در روز های مختلف تیمار های سه گانه با تیمار کنترل و با هم ۶۶
۳-۴-۴- مقایسه ی میانگین فراوانی میتوکندری ها در روز های مختلف تیمار های ۴ گانه ۶۶

فصل چهارم، بحث و نتیجه گیری ۶۸

۴-۱- مطالعه ی میکروسکپ نوری نفرون ها ۶۸
۴-۲- مطالعه ی فراساختار توبول ها ۷۲
۴-۳- ایمونوهیستوشیمی ۷۶
۴-۵- سلول های غنی از میتوکندری و میتوکندری ها ۷۹
۴-۵- تأثیر درجات مختلف شوری بر روی نحوه ی پراکندگی میتوکندری ها در سلول های غنی از میتوکندری توبول های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی در روز های مختلف ۸۰
۴-۶- تأثیر درجات مختلف شوری بر روی تغییر در فراوانی میتوکندری ها در سلول های غنی از میتوکندری توبول های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی در روز های مختلف ۸۱
۴-۷- مقایسه ی میانگین فراوانی میتوکندری ها در روز های اول، دوم و هفتم تیمار های مختلف با هم ۸۳
۴-۹- نتیجه گیری نهایی ۸۵
۴-۱۰- پیشنهادات ۸۷
منابع ۸۸

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

شکل ۱-۱- مکانیسم های تنظیم اسمزی در ماهیان آب شیرین و شور ۹

شکل ۱-۲- تیپ های مختلف کلیه در طبقه بندی اوگاوا ۱۰

فصل دوم: مواد و روش کار ۳۳

شکل ۲-۱- دستگاه های سنجش pH و اکسیژن محلول ۳۴

شکل ۲-۲- دستگاه هیستوکینت مدل RX 11B ۳۷

شکل ۲-۳- دستگاه میکروتوم مدل RM 2245 ..... ۳۹

شکل ۲-۴- دستگاه اولترامیکروتوم مدل Leica, uc 6 ..... ۴۳

شکل ۲-۵- دستگاه میکروسکپ الکترونی گذاره مدل CM 10 ..... ۴۴

فصل سوم: نتایج ۴۳

شکل ۳-۱- شمایی از جسمک کلیوی بچه ماهی هامور معمولی ۴۷

شکل ۳-۲- نشان دهنده ی قطعه ی گردنی، توبول های پروکسیمال اولیه و ثانویه و توبول جمع کننده ی کلیه ی *E. coioides* ۴۸

شکل ۳-۳- توبول پروکسیمال اولیه در ساختار نفرون های کلیوی *E. coioides* ۴۸

شکل ۳-۴- توبول پروکسیمال ثانویه در ساختار نفرون های کلیوی *E. coioides* ۴۹

شکل ۳-۵- توبول های دیستال کلیه ی *E. coioides* ۴۹

شکل ۳-۶- تصویر میکروسکپ نوری از توبول های کلیوی *E. coioides*، رنگ آمیزی PAS ۵۰

شکل ۳-۷- تصویر میکروسکپ نوری از توبول دیستال کلیه ی *E. coioides*، رنگ آمیزی PAS ۵۰

شکل ۳-۸- تصویر میکروسکپ الکترونی از قطعه ی گردنی توبول های کلیوی *E. coioides* ۵۱

شکل ۳-۹- تصویر میکروسکپ الکترونی از توبول های پروکسیمال اولیه و دیستال کلیه ی *E. coioides* ۵۲

شکل ۳-۱۰- تصویر میکروسکپ الکترونی از توبول پروکسیمال ثانویه ی کلیه ی *E. coioides* ۵۳

شکل ۳-۱۱- تصویر میکروسکپ الکترونی از توبول دیستال *E. coioides*، نشان دهنده ی چین خوردگی های غشایی و میتوکندری های فراوان توبول دیستال ۵۴

شکل ۳-۱۲- تصویر میکروسکپ الکترونی از توبول جمع کننده ی کلیه ی *E. coioides* ۵۵

شکل ۳-۱۳- مکان یابی آنزیم Na^+, K^+- ATPase در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در محیط با شوری ۱۰ ppt ۵۶

شکل ۳-۱۴- مکان یابی آنزیم Na^+, K^+- ATPase در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در محیط با شوری ۲۰ ppt ۵۷

شکل ۳-۱۵- مکان یابی آنزیم Na^+, K^+- ATPase در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در محیط با شوری ۴۰ ppt ۵۸
شکل ۳-۱۶- مکان یابی آنزیم Na^+, K^+- ATPase در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در محیط با شوری ۶۰ ppt ۵۸
شکل ۳-۱۷- تصویر میکروسکپ الکترونی از سلول های اپیتلیال توبول های کلیوی *E. coioides*، انواع میتوکندری از نظر ریخت ۵۹
شکل ۳-۱۸- تصاویر میکروسکپ الکترونی از سلول های اپیتلیال توبول های کلیوی *E. coioides*، جابجایی میتوکندری ها در روز های مختلف شوری ۱۰ ppt ..... ۶۱ و ۶۰
شکل ۳-۱۹- تصاویر میکروسکپ الکترونی از سلول های اپیتلیال توبول های کلیوی *E. coioides*، جابجایی میتوکندری ها در روز های مختلف شوری ۲۰ ppt ..... ۶۲ و ۶۱
شکل ۳-۲۰- تصاویر میکروسکپ الکترونی از سلول های اپیتلیال توبول های کلیوی *E. coioides*، جابجایی میتوکندری ها در روز های مختلف شوری ۴۰ ppt ۶۳
شکل ۳-۲۱- تصاویر میکروسکپ الکترونی از سلول های اپیتلیال توبول های کلیوی *E. coioides*، جابجایی میتوکندری ها در روز های مختلف شوری ۶۰ ppt ..... ۶۵ و ۶۴
شکل ۳-۲۲- مقایسه ی میانگین فراوانی میتوکندری ها در روز های مختلف تیمار های سه گانه با تیمار کنترل و با هم ۶۷
شکل ۳-۲۳- مقایسه ی میانگین فراوانی میتوکندری ها در روز های مختلف تیمار های ۴ گانه ۶۷

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

شوری یکی از مهم ترین فاکتور هایی است که ارگانیسم[1] های آبزی را تحت تأثیر قرار می دهد. برخی گونه ها زندگی خود را در یک محیط ساده که شوری آن می تواند ثابت یا متغیر باشد، سپری می کنند. بقیه با مهاجرت های پی در پی خود را درمعرض محیط های متفاوت از نظر شوری قرار می دهند. از آنجائیکه انتخاب طبیعی در همه مراحل تکامل عمل می کند، توانایی روبرو شدن با شوری در همه مراحل تکامل به ظرفیت تنظیم اسمزی این موجودات وابسته است (عملی که نهایتاً تحمل سطوح مختلف شوری را به آنها می دهد و آنها را در مواجهه با محیط های مختلف توانا می کند).

موجودات خشکی‌زی و آبزی باید فشار اسمزی سلول‌هایشان را بوسیله تنظیم جریان یون‌ها و آب از غشاء سلولی (اغلب با صرف انرژی) کنترل و ثابت نگه دارند. توانایی یک موجود آبزی در تحمل تغییرات وسیع شوری، یوری‌هالاینیتی[2] در مقابل استنوهالاینیتی[3] نامیده می‌شود. تلئوست‌های[4] دریایی با از دست دادن آب از طریق اسمز و ورود یون‌ها (اساساً Na^+ و Cl^-) از طریق انتشار به محیط داخلی بدن مقابله می کنند که این امر از طریق خوردن آب‌دریا، کاهش حجم ادرار و دفع فعال نمک از طریق آبششتحقق می یابد. در حالیکه مکانیسم‌های معکوسی در

1. Organism
2.Euryhalinity
3. Estenohalinity
4.Teleosts

ماهیان آب‌شیرین رخ می‌دهد (دفع ادرار نسبتاً رقیق، جذب فعال نمک از طریق آبشش و احتمالا تامین مقداری نمک از غذا) (Alderdice,۱۹۸۸).

تنظیم‌اسمزی[۱]، مکانیسم حفظ هومئوستازی مایعات درونی بدن است که مسئول کنترل اسمولالیته یا فشاراسمزی پلاسما می‌باشد. حفظ اسمولالیته‌ی[۲] نسبی بالا و پایین پلاسما نسبت به محیط به ترتیب هیپراسمورگولاسیون[۳] و هیپواسمورگولاسیون[۴] نامیده می‌شود.اطلاعات زیادی در مورد تنظیم اسمزی ماهیان استخوانی بالغ وجود دارد. در نتیجه یمکانیسم های درگیر، اسمولالیته خون همیشه در حد $mosM\ kg^{-1}$ ۲۸۰-۳۶۰ ثابت می ماند و یا اندکی تغییر می کند. بنابراین، شوری ایزواسمتیک[۵] تقریباً ۱۲-۰‰ است. در حد زیر این شوری، و به طور ویژه در آب شیرین، ماهی هیپراسمورگولار[۶] است و مجبور به وارد کردن آب به صورت غیر فعال و خارج کردن مقدار اندکی از یون ها و بخصوص Na^+ و Cl^- از طریق انتشار می باشد. مکانیسم های محدود کننده و جبرانی شامل کاهش نفوذ پذیری پوست، برداشت فعال یون در آبشش ها، کاهش سرعت نوشیدن آب و تولید حجم زیادی ادرار هیپوتونیک[۷] می باشند. بالاتر از شوری ایزواسموتیک، جانور هیپواسمورگولار[۸] است و موجود در معرض تهاجم یون ها و از دست دادن آب است. در این حالت علاوه بر کاهش نفوذ پذیری پوست، مکانیسم های تنظیم اسمزی سبب افزیش سرعت نوشیدن آب توسط موجود شده که به دنبال این امر افزایش برداشت آب به روش اسمز[۹] در دستگاه گوارش و به تبع آن برداشت فعال یون ها را در پی خواهد داشت. به دنبال این وقایع، ترشح فعال یون ها از خلال آبشش ها و تولید مقدار زیادی ادرار ایزوتونیک[۱۰] در موجود رخ خواهد داد.انتقال یون با واسطه آنزیم های مختلفی و عمدتاً توسط Na^+, K^+ -ATPase، و انتقال دهنده های یونی و کانال های یونی، مشابه با پروتئین های درون غشایی که در غشاء قاعده ای- جانبی[۱۱] یا سطح رأسی[۱۲] سلول های غنی از

1. Osmoregulation
2.Osmolality
3. Hyperosmoregulation
4.Hypoosmoregulation
5. Isosmotic
6. Hyperosmoregular
7. Hypotonic
8. Hyporosmoregular
9. Osmosis
10. Isotonic
11.Baso-lateral membrane
12. Apical

میتوکندری[1] (MRCs یا یونوسیت ها) قرار گرفته اند، انجام می شود. تبادلات آب نیز توسط کانال های سرتاسری آب یا آکواپورین ها[2] انجام می شود(Varsamos *et al.*,۲۰۰۵).

مکانیسم های تنظیم اسمزی ویونی درماهیان به طرز چشمگیری رشد نموده و به آنها امکان سکونت و زندگی در آشیان های اکولوژیک بالقوه ی بسیاری را (از آبهای سرد و یخزده قطبی گرفته تا دریاچه های قلیایی استوا) داده است (Flik and Verbost, ۱۹۹۳).

هامور معمولی*(Epinephelus coioides)* یکی از گونه های مهم و تجارت خلیج فارس به حساب می آید. هامورماهیان ارتباط نزدیکی با آبهای مصبی وخوریات دارند. بالغین این ماهی، یوری هالین[3] و یوری ترم[4] می باشند ومحل اصلی زندگی آنها درآبهای ساحلی می باشد(معاضدی،۱۳۸٦). بنابراین، اگر قرار باشد منابع و ذخایر این آبزیان را حفظ کرده و افزایش دهیم لازم است اطلاعات و یافته های بیشتر و کامل تری از فیزیولوژی ماهی به دست آوریم. تحقیقات بافت شناسی در اغلب موارد به طور مستقیم و یا غیر مستقیم سهم قابل ملاحظه ای در جهت کسب این نتایج به وجود می آورد (عزیزی، ۱۳۸۷). با توجه به اینکه تنظیم فشار اسمزی مایعات بدن نیز یکی از فعالیت های فیزیولوژیک مهم در جانوران آبزی محسوب می شود، در صورتیکه تنظیم اسمزی صورت نگیرد از دست رفتن یون ها و مولکول های حیاتی آنها و یا وارد شدن یون های خاص به خون و افزایش غلظت آنها می تواند تهدیدی برای ادامهی حیاتشان باشد (Nebel*et al.*,۲۰۰۵). در ماهیان بالغ، اندام های دخیل در تنظیم اسمزی (آبشش، کلیه، روده و ...)، یک شیب غلظت[5] یونی و اسمزی را بین مایعات بدن و محیط خارجی بوجود می آورند (Kaneko *et al.*, ۲۰۰۲). بررسی ساختار کلیه و وظایف آن در ماهیان، با توجه به دوره ی طولانی تکامل این حیوانات و سازگاری های گسترده از نظر شکل و فیزیولوژی، موضوعی بسیار پیچیده و وسیع است. روش های متفاوت زندگی در آب شیرین و شور نیازمند تنظیم ساختار کلیه ها، برای تطابق با وظایف متفاوت است (عزیزی، ۱۳۸۷).

1.Mitochondrian- Rich Cells or Ionosytes
2. Aquaporin
3.Euryhaline
4. Eurytherm
5.Gradient

با توجه به عدم مطالعه ی بافت کلیه طی سازگاری ماهی هامور با محیط های با شوری مختلف، تحقیق حاضر در راستای مطالعه تغییرات فیزیولوژیک سلول های اپیتلیال بخصوص رفتار اندامک تأمین کننده انرژی[1] یا میتوکندری[2] و نیز نحوه ی توزیع آنزیم سدیم-پتاسیم ATPase در کلیه بچه ماهی هامور طی روند سازگاری با شوری‌های مختلف تعریف شده است. با توجه به مطالبی که در بالا ذکر شد و نیز با علم به اینکه این ماهی در سواحل نیز زندگی می کند و با توجه به تغییر شوری آب های ساحلی در اثر بارندگی و تبخیر و همین طور تغییر شوری آب استخر های پرورشی در برخی نقاط استان خوزستان در بعضی از ماه های سال، این سوال مطرح می شود که در صورت تغییرات شوری محیط زیست این ماهی، سلول های غنی از میتوکندری و بویژه فراوانی و توزیع میتوکندری ها در آنها و پمپ Na^+, K^+-ATPase دستخوش چه تغییراتی خواهند شد؟ تا با یافتن پاسخ این سوال زمینه برای بهره برداری و توسعه پرورش این گونه با ارزش و حفظ ذخایر موجود فراهم شده و گامی مهم و مؤثر در پیشبرد اقتصاد منطقه ای و ملی برداشته شود.

۱-۱-۱-ضرورت انجام تحقیق

سلولهای بدن ماهیان برای زنده ماندن به یک محیط با غلظت های خاصی از مواد معین (از جمله یونها) محلول در آب نیاز دارند. در ماهیان استخوانی ساکن آب شور دیده می شود که غلظت نمک محیط داخلی آنها تقریباً ۱/۳محیط زندگی آنها است، پس ماهی برای اینکه بتواند زنده بماند باید یکسری تغییرات فیزیولوژیک در بدن خود انجام دهد تا سازگاری پیدا کند. باتوجه به اینکه ماهی هامور یک ماهی تجاری است پس لازم است برای اهداف اقتصادی وحفاظتی از این سازگاری فیزیولوژیک مطلع شویم. با توجه به یوری هالین[3] بودن ماهی هامور و نیز انتظار ایجاد تغییرات و تفاوت‌هایی در سطوح بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و سلولی در مواجهه با شوری‌های مختلف، این ماهیمی تواند مدل مناسبی برای بررسی مکانیسم‌های تنظیم اسمزی در شوری‌های متفاوت باشد.

1. Energy-supplying organelle
2.Mitochondria
3. Euryhaline

۱-۱-۲- فرضیه های تحقیق

با توجه به دامنه وسیع شوری های اعمال شده در محیط زندگی بچه ماهی هامور انتظار می رود نحوه ی توزیع آنزیم Na^+, K^+-ATPase در توبول های کلیوی بچه ماهی هامور شبیه توزیع آن در توبول های کلیوی دیگر گونه های یوری هالین باشد.

چون زندگی در محیط های با شوری بالاتر و یا پایینتر از محیط زندگی موجود سبب تغییراتی در مکانیسم های تنظیم اسمزی و نیز فعالیت آنزیم ها[1] و اندامک های سلولی درگیر در آن می شود، احتمال مشاهده تغییراتی در فراوانی و همچنین نحوه ی پراکندگی میتوکندری ها به منظور تأمین انرژی مورد نیاز سلول ها وجود دارد.

۱-۱-۳-اهداف تحقیق

بررسی ساختار[2]نفرون ها[3]بعنوان واحد های عملکردی کلیه و همچنین فراساختار[4] توبول های کلیوی[5] کلیه ی بچه ماهی هامور.

مکان یابی و مطالعه ی نحوه ی پراکندگی و توزیع آنزیم Na^+, K^+-ATPase در سلول های غنی از میتوکندری در مواجهه با شوری های مختلف در توبول های کلیوی بچه ماهی هامور.

بررسی تغییرات احتمالی در تعداد و نحوه ی توزیع میتوکندری ها بعنوان اندامک تأمین کننده انرژی برای آنزیم Na^+, K^+-ATPase در خلال تنظیم اسمزی در توبول های کلیوی بچه ماهی هامور.

۱-2-کلیات

شوری و تغییرات آن از جمله فاکتور های کلیدی اند که قدرت بقاء، متابولیسم[6] و توزیع ماهیان را طی روند تکامل تحت تأثیر قرار می دهند. استقرار موفق یک گونه از ماهیان در یک مکان مشخص، به توانایی آن در

1. Enzyme activity
2.Structure
3.Kidney nephrones
4.Ultrastructure
5.Kidney tubules
6. Metabolism

روبرو شدن با شوری در هر کدام از مراحل تکاملیبه تنظیم اسمزی وابسته است. اکنون به خوبی اثبات شده است که ماهیان استخوانی بالغ اسمولالیته خون خود را در حدود $^{-1}$۳۰۰mosM.kg حفظ می کنند، که این امر به سبب تنظیم مؤثر یون و آب در چند نقطه می باشد: پوست، روده، حفره های آبششی و اندام های ادراری(Varsamos *et al.*,۲۰۰۵). تنظیم یونی[1] و اسمزی در تلئوست‌ها بوسیله عملکردهای تلفیقی اندام‌های دخیل در تنظیم‌اسمزی از قبیل آبشش، کلیه و روده صورت می‌گیرد(Katoh ۲۰۰۴; Lee *et al.*, ۲۰۰۶ ; Evans, ۱۹۹۷and Kaneko,).

ماهی هامور یکی از با ارزش ترین ماهیان مأکول کویت است که در شرایط پرورشی از رشد نسبتاً سریعتری نسبت به شانک برخوردار است(Teng *et al.*,۱۹۸۰). این ماهی همچنین از ماهیان با ارزش از نظر تغذیه ای و اقتصادی خلیج فارس به شمار می رودو در سال های اخیر در مراکز تکثیر و پرورش جنوب کشور و به منظور حفظ ذخایر ارزشمند آن تکثیر، پرورش و رهاسازی می گردد.

۱-2-۱- بیولوژی ماهی هامور

این موجود رژیم گوشتخواری[2] داشته و در محیط طبیعی اغلب از بی مهرگان تغذیه می کند. در شرایط اسارت نیز از غذاهای دستی نظیر گوشت ماهیان کم ارزشتر نظیر خارو، مید، زوری و غیره تغذیه می کند. هامورماهیان ارتباط نزدیکی با آبهای مصبی وخوریات دارند. این ماهی را می توان بصورت توأم یا تک گونه ای پرورش داد. هامور ماهیان شنای نسبتاً تندی نزدیک به کف دریا دارند و با گوشت عالی ایکه دارند از نظر اقتصادی با ارزش می باشند. تخم ریزی آنها در اواخر زمستان تا اوایل بهار و بطور دقیق تر از نیمه دوم فروردین تا اواخر اردیبهشت صورت می گیرد. فلس های سیکلوئیدی وغالباً کتنوئیدی دارند.

هامور معمولی دارای بدنی نسبتا طویل ودوکی شکل که تا حدودی از دو طرف فشرده است می باشد. باله ی پشتی پیوسته بوده و پرده های بین خار باله ی پشتی تا حدودی شکاف دار می باشد. حاشیه باله های پشتی، دمی وسینه ای تا حدودی گرداست. تعداد خارهای باله ی پشتی ۱۱ عدد است که خار شماره ی ۳ویا ٤ از همه بزرگتر است وشعاع های نرم آن ۱۳تا ۱٦عدد می باشد، خارهای باله ی مخرجی سه عدد بوده که سومین خار بلندتر از

1. Ionregulation
2.Carnivore

دومی است وشعا ع های آن هشت عدد و شعاع های نرم باله یسینه ای ۱۸تا ۲۰عدد است وباله یدمی ۱۳تا ۱۵ شعاع منشعب دارد. تعداد فلس های خط جانبی ۵۸ تا ٦۵ عدد است و دارای سرو دهان بزرگ می باشند. در هر طرف آرواره ی پایین دارای دو ردیف دندان است، پیش سرپوش آبششی مضرس و به شکل نیمه زاویه است و سه خار پهن در قمست پشتی سرپوش آبششی دارند و روی بخش پایینی اولین کمان آبششی ١٤تا ۱۷ شعاع سخت وجود دارد. قطر سوراخ های بینی تقریباً برابراست. این گونه ها جثه بزرگی دارند و با حداکثر سن (۲۲ سالگی) طول نهایی ۱۱۱ سانتی متر و وزن کلی درحدود ۱۵ کیلوگرم دارند (Hamilton,۱۸۲۲).

ماهی هامور به طور گسترده ای درنواحی ساحلی اقیانوس های معتدله، گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان یافت می شود. اولین بلوغ جنسی نر در گروه طولی ۳۰-۱۵ سانتی متری و در ماده ها در گروه طولی ۵۰-۳۱ سانتی متری رخ می دهد. Teng از کویت در سال ۱۹۸۰ تخم ریزی نیمه طبیعی ماهی هامور را در هچری[1] انجام داد و شروع تخم ریزی آن را از ۲۸ اسفند تا ۲۳ فروردین، و دمای مطلوب تخم ریزی را ۲٦ ۲۲ درجه ی سانتی گراد عنوان نمود. از طرف دیگر در ایران نیز این عمل در سال ۱۳۸۲ بصورت مصنوعی و نیمه طبیعی در ایستگاه تحقیقاتی شیلات واحد بندر امام (ره) و ماهشهر انجام شد(معاضدی، ۱۳۸٦).

۱-2-۲-رده بندی هامور ماهیان

از نظر اقتصادی گونه های مربوط به زیر خانوادهی اپینفلینه[2] اهمیت بیشتری دارند که دارای ۱۵۹ گونه وابسته به ۱۵ جنس و به اسم گروپرها[3] یا هامور ماهیان و یا Rockcods, Seabass شناخته شده اندکه اصلی ترین جنس در خلیج فارس ودریای عمان اپی نفلسوس[4] می باشد وگونه های شناخته در خلیج فارس عبارتند از:

Kingdim; Animalia

Phylum; Chordata

Subphylum; Vertebrata

Superclass; Osteichthyes

Class; Actinopterygii

1.Hatching
2.Epinephlinae
3.Grouper
4.Epinephelus

Sub class; Neopterygii

Infraclass; Teleostei

Super order; Acanthopteryygii

Order; Perciformes(perch-like fishes)

Sub order; Percoidei

Family; Serranidae

Sub family; Epinephelinae

Tribe; Epinephelini

Genus; Epinephelus, grouper

Orange-spotted grouper(Hamilton,۱۸۲۲)Species; *Epinephelus coioides*

۱-2-3- تنظیم اسمزی و اندام های دخیل در آن

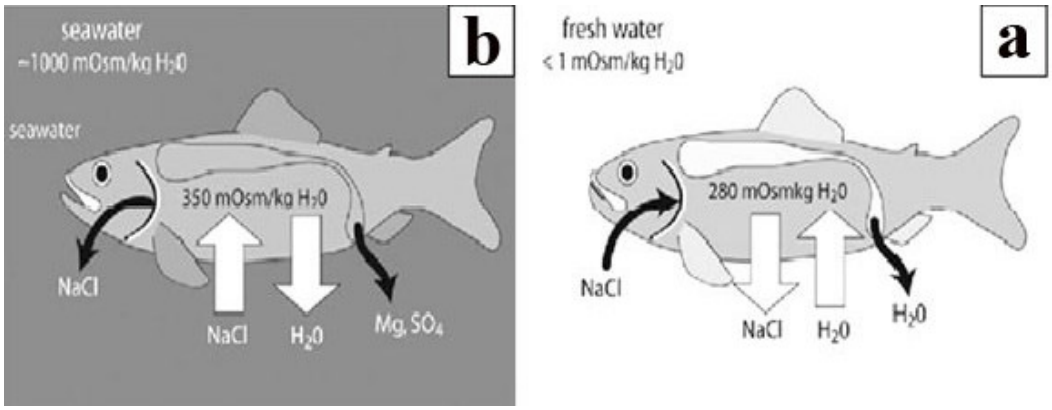
۱-۲-۳-۱- تنظیم اسمزی

جابجایی و زندگی در دو محیط مختلف از نظر ترکیبات شیمیایی و فشار اسمزی مستلزم ایجاد سازش‌های خاص و تغییرات فیزیولوژیکی و بافتی در آبزیان است تا قادر به حفظ هومئوستازی [1] و زندگی عادی باشند. یکی از سازگاری های ماهیان درآب تنظیم اسمزی است. تنظیم اسمزی کنترل غلظت الکترولیت ها[2] و مواد آلی حل شده در مایعات بدن و حفظ و نگه داری تعادل آب و نمک هاست(مسافر خورجستان و همکاران، ۸۷). یکی از مهم ترین تنظیماتی که همه انواع ماهیان باید در محیط اختصاصی خود اعمال کنند حفظ تعادل آب و نمک بافت در حد مناسب است. بیشتر گرادیان اسمزی تجربه شده توسط ماهیان در آب دریا اتفاق می افتد، جائی که ممکن است این گرادیان به بالای $mosmol.kg^{-1}$ ۶۰۰-۸۰۰ برسد. در این وضعیت و برای جبران سرعت نوشیدن آب ۳ تا ۱۰ بار بیشتر از ماهیان آب شیرین افزایش می یابد(Evans *et al.*,۲۰۰۵). پس ازآن، از دست دادن آب

1.Homeostasis
2.Electrolytes

وجذب یون ها را داریم.غلظت یون ها در محیط بیرون خیلی بیشتر ازبدن است پس بدلیل فشار اسمزی بیشتر املاح جذب می کند. مکانیسم تنظیم اسمزی در آب های شور هیپواسمولاریتی[1] می باشد.ماهیان استخوانی اسمولالیته و غلظت یون های بدن خود را در سطحی متفاوت با محیط خارج حفظ می کنند و معمولاً اسمولالیته پلاسما در حدود ۱/۳ اسمولالیته آب دریا حفظ می شود. ماهیان برای نگهداری تعادل آب و یون های مایعات بدن در محیط های هیپوتونیک و هیپرتونیک[2]، مکانیسم های تنظیم اسمزی پیشرفته ای دارند. تنظیم اسمزی در ماهیان استخوانی بالغ به طور عمده شامل انتقال آب و یون ها توسط آبشش کلیه و روده است. در ماهیان آب شیرین، آب وارد بدن شده و نمک از طریق سطح نفوذ پذیر بدن که بخش عمده یآن توسط اپیتلیوم[3] آبشش اشغال شده است از دفع می شود. برای مقابله با این مشکلات، آنها آب اضافی را با تولید ادرار رقیق[4] از طریق کلیه خارج کرده و یون ها را از طریق اپیتلیوم آبشش بر می دارند. بالعکس، ماهیان دریایی آب از دست می دهند و نمک جذب می کنند. در این ها کمبود آب بواسطه نوشیدن آب و جذب آن در روده جبران شده و یون های اضافی بطور فعال توسط آبشش و کلیه دفع می شوند (Kaneko *et al.*,۲۰۰۲).

۱-۲-۳-۲-مکانیسم های تنظیم اسمزی در ماهیان آب شیرین و شور



شکل ۱-۱-مکانیسم های تنظیم اسمزی در ماهیان آب شیرین و شور (Evans *et al.*,۲۰۰۵)

شکل ۱-۱، a: مکانیسم های تنظیم اسمزی در ماهیان بالغ آب شیرین را نشان می دهدکه درآب شیرین ماهیان استخوانی Hyperosmoregulate بوده، در روز های آغازین زندگی پوست وکیسه ی زرده نقش فعالی در

1. Hypoosmolarity
2. hypertonic
3.Epithelium
4.Dilute urine