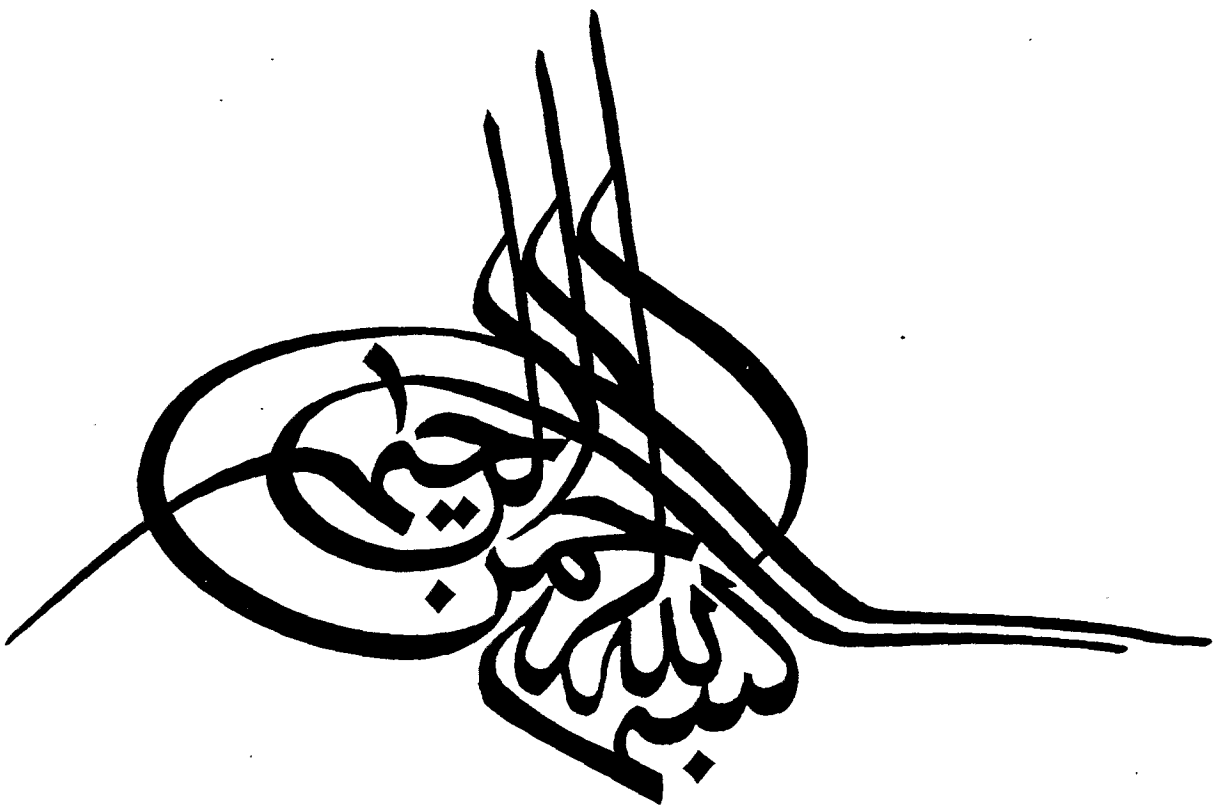


١٤١٥٢٢

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(زیست شناسی دریا-جانوران دریا)

مطالعه تغییرات خون هنگام مقابله با کمبود اکسیژن در ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio*

از:

زهرا بهرامی نژاد جونقانی

معاونت محترم تحصیلات تکمیلی
دانشگاه گیلان

استاد راهنما:

دکتر نادر شعبانی پور

۱۳۸۹/۷/۳

شهریور ۱۳۸۸

۱۴۱۵۲۲

تقدیم :

تقدیم به مادر و پدر نازنینم

به پاس سالها تدریس صادقانه

تقدیر و تشکر

خداوند مهربانم ممنونم، به خاطر راهی که به من نشان دادی و نگاهی که به من بخشیدی.
از **پدر و مادر عزیزم** بخاطر تمامی حمایت ها، تشویق ها و همدلی ها ممنونم.
از استاد راهنمای بزرگوارم **جناب آقای دکتر نادر شعبانی پور** که همواره مرا از راهنمایی ها و مساعدت های خود بهره مند نموده اند تشکر می کنم.

و از همه عزیزانی که مرا در انجام این پژوهش یاری نمودند، ممنونم.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

چکیده فارسی ..... خ
چکیده انگلیسی ..... د

فصل اول / مقدمه و کلیات

۱-۱ خون ماهیان ۲
۱-۱-۱ شکل گیری سلول های خونی ۲
۱-۱-۲ گلبول های قرمز ٤
۱-۱-۳ مرفولوژی سلول های قرمز ٥
۱-۱-۳-۱ هماتوکریت ٥
۱-۱-۳-۲ اندازه و شکل سلول های قرمز ٥
۱-۱-٤ فیزیولوژی گلبول قرمز ٦
۱-۱-٤-۱ هموستاز اریتروسیت ٦
۱-۱-٤-۲ متابولیسم سلول های قرمز ٦
۱-۱-٥ انتقال گاز ۷
۱-۱-٥-۱ ساختار هموگلوبین ۸
۱-۱-٥-۲ میل ترکیبی اکسیژن ۸
۱-۱-٥-۳ اثرات غلظت دی اکسید کربن و pH بر میل ترکیبی اکسیژن ۱۰
۱-۲ اهمیت اکسیژن برای ماهیان ۱۰
۱-۲-۱ میزان حلالیت اکسیژن در آب ۱۰
۱-۲-۲ نیاز اکسیژنی گونه های مختلف ۱۱
۱-۳ هیپوکسی ۱۲
۱-۳-۱ سازش ماهیان به هیپوکسی ۱۳
۱-۳-۱-۱ سازش خونی ماهیان به هیپوکسی ۱٤
۱-۳-۱-۲ پاسخ آدرنرژیکی گلبول قرمز ۱٤
۱-۳-۱-۳ سازش متابولیکی به هیپوکسی ۱٦
۱-٤ هیپوکسی بعنوان فاکتور استرس زا ۱۷
۱-٤-۱ گلوکورتیکوئید (کورتیزول) ۱۸
۱-٤-۲ اعمال متابولیکی کورتیزول ۱۸
۱-٥ بیولوژی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* ۱۹
۱-٥ رده بندی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* ۲۱

فصل دوم / مواد و روشها

۲-۱ مواد و روشها ۲۳
۲-۱-۱ نگهداری نمونه ها در آزمایشگاه ۲۳
۲-۱-۲ طرح آزمایش ۲۳
۲-۲ روشهای آزمایشگاهی ۲۶
۲-۲-۱ روش هموگلوبینومتری ۲۶
۲-۲-۲ روش تهیه گسترش خونی توسط لام ۲۶
۲-۲-۳ رنگ آمیزی گستره خونی با محلول رنگی گیمسا ۲۷
۲-۲-۳-۱ بررسی مورفولوژیکی گلبول های قرمز ۲۷
۲-۲-٤ اندازه گیری هماتوکریت ۲۷
۲-۲-۵ شمارش گلبول های قرمز ۲۷
۲-۲-۵-۱ نحوه محاسبه گلبول های قرمز ۲۸
۲-۲-٦ اندازه گیری کورتیزول پلاسما ۲۹
۲-۲-٦-۱ رادیو ایمونواسی ۲۹
۲-۲-٦-۲ روش شناسی ۲۹
۲-۲-۷ رنگ سنجی ۳۱
۲-۲-۷-۱ اندازه گیری لاکتات پلاسما به روش آنزیمی ۳۱
۲-۲-۷-۲ اندازه گیری گلوکز پلاسما به روش آنزیمی ۳۲
۲-۳ بافت شناسی طحال ۳۳
۲-۳-۱ تثبیت ۳٤
۲-۳-۲ آبگیری و شفاف سازی ۳٤
۲-۳-۳ تهیه بلوک پارافینی ۳۵
۲-۳-٤ برش بافت ۳۵
۲-۳-۵ چسباندن و رنگ آمیزی نمونه ۳۵
۲-٤ آنالیز داده ها و مقایسه آماری ۳٦

فصل سوم / نتایج

۳-۱ بررسی اثر هیپوکسی بر پارامترهای گلبول قرمز ۳۸
۳-۱-۱ بررسی اثر هیپوکسی بر خصوصیات مورفولوژیکی گلبول قرمز ۳۸
۳-۱-۲ بررسی اثر هیپوکسی بر میزان هماتوکریت ٤۰
۳-۱-۳ بررسی اثر هیپوکسی بر غلظت هموگلوبین خون ٤۲
۳-۱-٤ بررسی اثر هیپوکسی بر شمارش گلبول قرمز ٤۳
۳-۱-۵ بررسی اثر هیپوکسی بر پارامترهای ثانویه گلبول قرمز ٤۳
۳-۱-۵-۱ حجم متوسط گلبول قرمز ٤٤

۳-۱-۵-۲ هموگلوبین متوسط گلبول قرمز ٤٥
۳-۱-۵-۳ غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز ٤٧
۳-۲ بررسی غلظت هورمون کورتیزول ٤٨
۳-۳ بررسی غلظت گلوکز پلاسما ٤٩
۳-٤ بررسی میزان لاکتات پلاسما ٥٠
۳-٥ بررسی بافت طحال ٥١
۳-٥-۱ بررسی بافت شناسی طحال ٥١
۳-٥-۲ بررسی وزن طحال در طی آزمایش ٥٢

فصل چهارم / بحث

٤-۱ بررسی اثر هیپوکسی بر گلبول قرمز ٥٥
٤-۱-۱ بررسی پاسخ آدرنرژیکی گلبول قرمز در طی هیپوکسی ٥٥
٤-۱-۲ بررسی اثر هیپوکسی بر پارامترهای اولیه و ثانویه گلبول قرمز ٥٦
٤-۲ بررسی اثر هیپوکسی بر میزان لاکتات پلاسما ٥٩
٤-۳ بررسی اثر هیپوکسی بر میزان کورتیزول ٦٠
٤-٤ بررسی اثر هیپوکسی بر میزان گلوکز پلاسما ٦٢
٤-٥ بررسی اثر هیپوکسی بر بافت طحال ٦٣

پیشنهادات ٦٥

منابع ٦٦

ضمائم ٧٣

فهرست جدولها :

جدول ۱-۱ اطلاعات کلی از گلبول قرمز و غلظت هموگلوبین ماهیان مختلف ٤
جدول ۲-۲ مشخصات تیمارهای آزمایش ۲۵
جدول ۳-۱ عرض، طول و مساحت گلبول قرمز در تیمارهای مختلف ۳۸
جدول ۳-۲ میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز در تیمارهای مختلف ٤۱
جدول ۳-۳ میزان MCV، MCH و MCHC در تیمارهای مختلف ٤٤
جدول ۳-٤ میزان کورتیزول، گلوکز و لاکتات پلاسما در تیمارهای مختلف ٤۹
جدول ۳-۵ وزن طحال در تیمارهای مختلف ۵۳

فهرست شکلها :

شکل ۱-۱ منحنی تفکیک اکسیژن خون ۱۰
شکل ۱-۲ مدل شماتیکی از تاثیر کتکول آمین ها بر گلبول قرمز ماهیان استخوانی ۱۵
شکل ۱-۳ ماهی کپور معمولی ۲۰
شکل ۲-۱ آکواریوم های استفاده شده در آزمایش ۲٤
شکل ۲-۲ نمونه برداری خون از سیاهرگ دمی ۲۵
شکل ۲-۳ لام نئوبار ۲۸
شکل ۲-٤ پنج مربع شمارش گلبول قرمز ۲۸
شکل ۲-۵ کیت مورد استفاد بهمراه اجزای داخلی آن جهت اندازه گیری هورمون کورتیزول ۲۹
شکل ۲-٦ دستگاه شمارنده و پردازشگر گاما کانتر ۳۰
شکل ۲-۷ دستگاه آنالیزر Technicon RA-۱۰۰۰ ..... ۳۲
شکل ۲-۸ نحوه برش برای خارج کردن طحال ۳٤
شکل ۳-۱ گلبول قرمز در تیمار نورموکسی ۳۹
شکل ۳-۲ تورم گلبول قرمز در هیپوکسی ۳۹
شکل ۳-۳ بافت طحال نمونه شاهد ۵۲
شکل ۳-٤ بافت طحال در طی هیپوکسی ۵۲

فهرست نمودارها :

نمودار ۳-۱ مساحت گلبول قرمز در تیمارهای مختلف ٤۰
نمودار ۳-۲ میزان هماتوکریت در تیمارهای مختلف ٤۱
نمودار ۳-۳ میزان غلظت هموگلوبین در تیمارهای مختلف ٤۲
نمودار ۳-٤ تعداد گلبول قرمز در تیمارهای مختلف ٤۳
نمودار ۳-۵ میزان MCV در تیمارهای مختلف ٤۵
نمودار ۳- ٦ میزان MCH در تیمارهای مختلف ٤٦
نمودار ۳-۷ میزان MCHC در تیمارهای مختلف ٤۷

نمودار ۳-۸ غلظت کورتیزول پلاسما در تیمارهای مختلف ٤٨
نمودار ۳-۹ غلظت گلوکز پلاسما در تیمارهای مختلف ٥٠
نمودار ۳-۱۰ غلظت لاکتات پلاسما در تیمارهای مختلف ٥١
نمودار ۳-۱۱ وزن طحال در تیمارهای مختلف ٥٣

چکیده

مطالعه تغییرات خونی هنگام مقابله با کمبود اکسیژن در ماهی کپور معمولی Cyprinus carpio.

زهرا بهرامی نژاد جونقانی

هیپوکسی (کمبود اکسیژن) یکی از فاکتور های مهم استرس در ماهیان است که منجر به تغییر پارامترهای خونی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می شود. کپور معمولی یکی از ماهیان اقتصادی است که مقاوم به هیپوکسی می باشد. در این تحقیق اثر هیپوکسی و بازگشت به نورموکسی بر فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی شامل هماتوکریت، غلظت هموگلوبین، شمارش گلبول های قرمز، بررسی مورفولوژی گلبول قرمز، میزان کورتیزول، گلوکز و لاکتات پلاسما بررسی شد. در طی هیپوکسی ماهیان در آکواریوم های شیشه ای نگهداری شدند و توسط سولفیت سدیم به کاهش اکسیژن آب مبادرت شد. نمونه های ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرمی کپور در معرض ۰، ۱۲، ۲٤، ۷۲، ۱۲۰ ساعت هیپوکسی (اکسیژن ۰٫۵ میلی متر در لیتر) قرار گرفتند که پس از مدت تعریف شده، ماهیان تحت آزمایش بلافاصله خونگیری شدند و طحال نیز پس از وزن کردن جهت بررسی بافت شناسی مورد استفاده قرار گرفت. یافته ها افزایش قابل ملاحظه ای را در شاخص های هماتوکریت، غلظت هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز در پاسخ به هیپوکسی نشان داد. میزان کورتیزول، گلوکز و لاکتات خون نیز افزایش یافت. بعلاوه تغییر اندازه گلبول قرمز در نتیجه تورم گلبول قرمز در نمونه های در معرض هیپوکسی دیده شد که علت آن پاسخ آدرنرژیکی گلبول های قرمز است. وزن طحال نیز کاهش یافت که بعلت آزادشدن گلبول های قرمز از طحال می باشد. تمامی این نتایج نشان دهنده سازگاری ماهی کپور به هیپوکسی است که آنرا گونه ای مقاوم به کمبود اکسیژن می سازد.

کلمات کلیدی: هیپوکسی، کپور معمولی، فاکتورهای خونی، گلبول قرمز، طحال

Abstract

The study of blood charactrisics in the common carp (*Cyprinus carpio*) during hypoxia.

Zahra Bahrami nejad jooneghani

Hypoxia is one of the most important stress factors in fish which leads to hematological, physiological and biochemistrical parameters changes. Common carp is one of the most commercially important species and it also has the ability to tolerate hypoxia.

The effects of exposure to hypoxia and subsequent normoxic recovery on glucose, cortisol, lactat, hematocrit, haemoglobin concentration, erythrocyte morphology and erythrocyte numbers in the whole blood of Common carp were studied. During exposure to hypoxia fish were kepet in some glass aquariums continuously supplied with sodium sulfite which can decrease the level of oxygen. In this study specimens of *Cyprinus carpio* were exposed to ۰, ۱۲, ۲٤, ۷۲, ۱۲۰ hours hypoxia after which samples of blood and spleen were taken for hematological and histological analysis.

The results showed a significant increase in hematocrit, hemoglobin concentration and erythrocyte numbers, cortisol, glucose and lactate. Furthermore, variation of erythrocyte size was observed due to erythrocyte swelling in specimens exposed to hypoxia. The reason is adrenergic response of erythrocyte.

A reduction in spleen weight was also observed, due to the release of erythrocyte from spleen. All the results showed hypoxia adaptation in common carp which make this fish hypoxia-tolerant specie.

Keywords: Hypoxia, Common carp, Blood parameters, Erythrocyte, Spleen

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- خون ماهیان

تاریخچه مطالعات خون شناسی در ماهیان به سالهای ۱۸۰۰ میلادی باز می گردد. تا کنون مطالعات خون شناسی ابزاری مناسب در تشخیص بیماری ماهیان و عملکرد سیستم ایمنی محسوب می شود [Stoskopfe, 1993]. خون ماهیان نیز مشابه خون سایر مهره داران شامل پلاسما و سلول های خونی است. حجم خون ماهیان استخوانی در مقایسه با دیگر مهره داران کم است و حدود پنج درصد وزن بدن ماهیان است [Roberts, 2001]. بخش سلولی شامل گلبول قرمز (اریتروسیت[1] ها) و گلبول های سفید (لوکوسیت[2] ها) می باشد. لکوسیت ها در ماهیان و به طور کلی در مهره داران به دو گروه گرانولوسیت[3] ها و آگرانولوسیت[4] ها تقسیم می شوند. آگرانولوسیت ها فاقد گرانول در سیتوپلاسم خود بوده و هسته های آنها فاقد لوب می باشد و از این رو به سادگی از گرانولوسیت ها که دارای گرانول و هسته های چند لوبی هستند، تشخیص داده می شوند. گرانولوسیت ها شامل سه گروه نوتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل می باشند. آگرانولوسیت ها شامل ۲ گروه منوسیت و لنفوسیت می باشد.

پلاسما بخش مایع خون می باشد و حاوی آب، پروتئین ها، الکترولیت ها (یون های سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، کلراید، بی کربنات کلسیم، فسفات و سولفات)، مواد مغذی (گلوکز، لیپید، اسیدهای آمینه)، گازهای خونی (اکسیژن، دی اکسید کربن، نیتروژن) و مواد تنظیم کننده (هورمون ها و آنزیم ها) است[Kumar and Tembhre, 1998]. پلاسما در ماهیان استخوانی دریایی نواحی قطبی حاوی پروتئین های ضد انجماد (AFP) یا گلیکو پروتئین های ضد انجماد (AFGP) می باشد که این پروتئین ها منجر به کاهش نقطه انجماد پلاسما بدون تأثیر بر نقطهٔ ذوب می شوند [عسکریان، ۱۳۸۵].

۱-۱-۱- شکل گیری سلول های خونی

همه ماهیان فاقد مغز استخوان و غدد لنفاوی می باشند [Stoskopfe, 1993]. منشاء سلول های میلوئید[5] در دوزیستان مهره داران عالیتر مغز استخوان است. بافت های اصلی خون ساز ماهیان استخوانی تیموس، طحال و کلیه می باشد

[1] Erythrocyte
[2] Leukocyte
[3] Granulocyte
[4] Agranulocyte
[5] Myeloid

[Satchel, 1971]. تیموس از بافت های لنفومیلوئید[1] (تولید کننده لنفوسیت و گرانولوسیت) تشکیل شده است که در مراحل ابتدائی رشد ماهیان استخوانی سلول های خونی تولید می کند [Ellis, 1977]. محل خون سازی ماهیان استخوانی عالی، اساساً کلیه و طحال می باشد [Satchel, 1971]. در کوسه ها بافت لنفومیلوئید در ارگان های اپی گنال و اندام لیدیگ و در ماهیان خاویاری در پریکارد قلب و پرده های مغزی نیز وجود دارد. در جمجمه ماهیان هولوسفال[2] نیز بافت لنفومیلوئیدی یافت می شود [Fange, 1984]. کلیه یکی از اندام های خون ساز اصلی در ماهیان استخوانی است [Cattoon, 1951]. دو مکان اصلی خون سازی در اغلب ماهیان در قسمت رأسی کلیه و بدنه کلیه دیده می شود. معمولاً رأس کلیه مهمترین مکان تولید سلول های خونی است [Ellis, 1977] . طحال تنها اندام شبه عقده لنفاوی در ماهیان استخوانی است. رنگ آن قرمز تیره یا سیاه است و در ماهی سالم دارای لبه های مشخص و تیزی است، که در محل نزدیک خم بزرگ معده یا در خمیدگی روده قرار گرفته است [Roberts, 2001].

از دیگر اندام های مهم خون ساز در ماهیان طحال است که در ماهیان استخوانی شامل دو بخش پالپ سفید و پالپ قرمز می باشد. اریتروسیت ها و ترومبوسیت ها (پلاکتها) از پالپ قرمز و لمفوسیت ها و گرانولوسیت ها از پالپ سفید مشتق می شوند [Fange and Nilsson, 1985]. در اغلب ماهیان اجزای اصلی طحال، الیپسوئیدها[3]، پالپ[4] و مراکز ملانو ماکروفاژها[5] است [Roberts, 2001]. الیپسوئیدها، مویرگ های صاف کننده با دیواره ضخیم هستند که از تقسیم سرخرگهای کوچک طحال منشا می گیرند. الیپسوئیدها حاوی گلبول های قرمز و سلول های فاگوسیت کننده هستند.

طحال ماهیان غضروفی و ماهیان استخوانی عالی توسط اعصاب احشایی (اتونومیک) عصب دهی می شوند. اعصاب مذکور، این اندام را در مواقع استرس مانند هیپوکسی (کاهش اکسیژن) تحریک می کنند تا منقبض شود [Fange and Nilsson, 1985]. علاوه بر تحریک عصبی مستقیم، تحریک هورمونی نیز سبب انقباض طحال می شود [Nilsson and Grove, 1974]. تولید گلبول قرمز در طحال شامل گلبول های قرمز نابالغ یا سلول هایی است که بعد از ورود به خون تمایز می یابند [Fange and Nilsson, 1985].

[1] Lymphomyeloid
[2] Holocephal
[3] Ellipsoid
[4] Pulp
[5] Melano-macrophage

۱-۱-۲- گلبول های قرمز

سلول غالب در خون اکثر ماهیان، اریتروسیت است. همانطور که در جدول ۱-۱ می بینید تعداد اریتروسیت در خون ماهیان متغیر می باشد. در بسیاری از ماهیان استخوانی، تعداد اریتروسیت ۱ تا ۳ میلیون در هر میلی متر مکعب خون می باشد.

جدول ۱-۱ : اطلاعات کلی از گلبول قرمز و غلظت هموگلوبین ماهیان مختلف [Hoard *et al.*, 1992].

	هماتوکریت ٪	طول اریتروسیت (µm)	تعداد اریتروسیت (10^3/µl)	غلظت هموگلوبین (g٪)
دهان گردان *Myxine glutinosa*	۱۹/۱	۱۵-۳۵	۰/۱۲-۰/۹	٤/۱
ماهیان غضروفی *Squalus acanthias*	۱٦/۳	۲۱	۰/۰٦-۰/۰۷	۳/۲
ماهیان استخوانی کم تحرک *Lophius piscatorius*	۱۷/۲	۱۳-۱۵	۰/۹۷-۱/۳۰	۳/۲
ماهیان استخوانی پرتحرک *Thunnu thynnus*	٥۲/٤	۱۳/۱	۲/۱٥	۱٥/٤

سلول های قرمز ماهیان هسته دار می باشد. به دلیل تفاوت در محیط و شیوه زندگی ماهیان، ویژگی های خونی آنان نیز بنابر نیازهای متابولیکی آنها تغییر می کند. ماهیان شناگر سریع به طور میانگین نسبت به گونه های کم تحرک تر اریتروسیت بیشتری دارند (جدول۱-۱). ماهیان پرتحرک سلول های قرمز کوچکتری دارند. شاید کوچک تر بودن اندازه ی سلول در ماهیان فعال، این امکان را فراهم می کند که گازهای تنفسی ضروری مانند اکسیژن مسیر کوتاه تری را برای انتشار خود کنند. کوتاه بودن طول مسیر انتشار و زیاد بودن تعداد گلبول قرمز، جذب اکسیژن را در آبشش ها و تحویل آن به عضلات شنا را کارآمدتر می کند [ستاری، ۱۳۸۱].

در حالت کلی، ارتباط معکوسی بین اندازه و تعداد گلبول های قرمز وجود دارد. ماهیان غضروفی معمولا تعداد اریتروسیت کمتری در خون نسبت به ماهیان استخوانی دارند ($۰/۱-۰/٤\times۱۰^{٦}/\mu l$) [Hoard *et al.*, 1992]. که این موضوع بدلیل بزرگ بودن اریتروسیت های ماهیان غضروفی می باشد (جدول۱-۱). در برخی ماهیان قطبی، در خانواده Chanichthyidae، خون فاقد هموگلوبین بوده و یا دارای هموگلوبین اندکی می باشد. برخی از این ماهیان گلبول قرمز نداشته و یا خون حاوی تعداد کمی اریتروسیت است. برای مثال در خانواده Nototheniidae خون حاوی $۰/۳۸-۱/۲\times ۱۰^{٦}$ اریتروسیت در هر میلی لیتر بوده [Hureau, 1966] و تمام اکسیژنی که به بافت منتقل می شود، به صورت محلول در خون است.

۱-۱-۳- مرفولوژی سلول های قرمز

۱-۱-۳-۱- هماتوکریت[1]

یکی از واحدهای بیانگر اریتروسیت ها در خون، هماتوکریت است. در واقع درصد گلبول های قرمز نسبت به حجم کل خون را هماتوکریت می نامند. هماتوکریت خون ماهیان از صفر تا بیش از ۵۰ درصد متغیر است و در اکثر ماهیان استخوانی هماتوکریت بین ۲۰ تا ٤۰ درصد متغیر است. در ماهیان غضروفی میزان هماتوکریت کمتر از ۲۵ درصد است [Hoard *et al.*, 1992]

۱-۱-۳-۲- اندازه و شکل سلول های قرمز

سلول های قرمز بالغ معمولاً بیضوی شکل با هسته فشرده می باشند. در تعداد کمی از گونه ها سلول های قرمز تقریباً کروی هستند. مانند لامپری *Lampetra fluciatillis* که سلول قرمز کروی دارد و شبیه اریتروسیت پستانداران است [Potter *et al.*, 1982]. اندازه سلول قرمز بین گروه های سیستماتیکی ماهیان متفاوت است. طول سلول قرمز ماهیان استخوانی از ۱۲ تا ۱۵ میکرون و عرض آنها از ۸/۵ تا ۹/۵ میکرون متغیر است. ماهیان غضروفی همانطور که قبلاً نیز ذکر شد، سلول قرمز بزرگتری دارند که طول آنها از ۲۰ تا ۲۷ میکرون و عرض آنها از ۱٤ تا ۲۰ میکرون متغیر است [Hoard *et al.*, 1992].

[1] Hematocrit

۱-۱-٤- فیزیولوژی گلبول قرمز

۱-۱-٤-۱- هموستاز اریتروسیت

شاخص هماتوکریت در میان یک گونه ثابت اما در بین گونه ها متفاوت است. هیچ گرایش فیلوژنتیکی در ارتباط با هماتوکریت در گونه ها وجود ندارد. پارامترهای خونی در ارتباط با اریتروسیت (غلظت هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد اریتروسیت) ارتباط مستقیم با شیوه زندگی ماهیان دارند. همانطور که گفته شد، ماهیان شناگر سریع به طور میانگین اریتروسیت های بیشتر، هماتوکریت بزرگتر و مقدار هموگلوبین بیشتری نسبت به گونه های کم تحرک تر دارند (جدول ۱-۱). برای مثال اسکومبریدهای[1] گرمسیری، مقدار هموگلوبین بیشتر از ۲۰ $g/_{100}$ ml دارند [Klawe *et al.*, 1963]. استرس های محیطی می تواند منجر به تغییرات در پارامترهای خونی شود [Casillas and Smith, 1977].

مقدار اکسیژن کم در محیط ارتیروپویزیز[2] (تولید اریتروسیت) را تحریک می کند و در نتیجه مقدار هماتوکریت، غلظت هموگلوبین و تعداد اریتروسیت ها افزایش می یابد. با وجود اینکه در شرایط عادی ماهیان استخوانی قادر به حفظ ثبات تعداد گلبول های قرمز خون هستند، هماتوکریت اغلب آنها در طی چرخه زندگی (در فصول مختلف) تغییر می کند [Blaxhall, 1973]. برای مثال تغییرات فصلی در هماتوکریت ماهی فلاندر[3] *Pseudopleuronectes americanus* ممکن است به علت فاکتورهای هورمونی یا تغذیه ای رخ دهد [Bridges *et al.*, 1976].

نابودی و از بین رفتن اریتروسیت های پیر یا آسیب دیده بوسیله ماکروفاژها، در طحال و کلیه صورت می گیرد. سلول های قرمز ماهیان طول عمر بیشتری نسبت به سلول های قرمز بدون هسته پستانداران که طول عمرشان در حدود ۱۲۰ روز است، دارند. آزمایشات ایزوتوپی که بر روی سلول قرمز ماهی استخوانی انجام شد، طول عمر بیشتر از ۱۵۰ روز را برای یک سلول قرمز تخمین زده است [Hevesy *et al.*, 1964].

۱-۱-٤-۲- متابولیسم سلول های قرمز

متابولیسم سلول های قرمز مهره داران، انرژی برای حفظ شکل سلول و برای انتقال مواد از بین غشای سلول را فراهم می کند [Nikinmaa, 1990]. پمپ سدیم و فرآیند فسفریلاسیون ۵۰ درصد انرژی کل را مصرف می کند. اریتروسیت ماهیان از

[1] Scombridae
[2] Erythropoiesis
[3] Flounder

لحاظ متابولیکی از اریتروسیت پستانداران فعال تر است [Hoard *et al.*, 1992]. غشای سلول قرمز حاوی پروتئین های ناقل برای عبور آنیون و کاتیون ها است. تبادل کاتیون می تواند بوسیله پمپ سدیم رخ دهد. در مورد انتقال کاتیون بوسیله مولکول ها اطلاعات کمی در اختیار است. یون های کلراید از بین غشای سلول قرمز بسیار آرام می گذرند. در لامپری و هگ فیش[1] ها سلول قرمز به بی کربنات نفوذ ناپذیر است. این تبادل بین کلراید و بی کربنات را مشکل می سازد [Nikinmaa, 1990]. غشاهای اریتروسیت بسیاری از مهره داران دارای رسپتورهای بتا آدرنرژیک[2] برای کتکول آمین ها هستند. اگرچه اریتروسیت ماهیان غضروفی و دهان گرد برخلاف اریتروسیت دیگر مهره داران، بوسیله کتکول آمین ها تأثیر نمی پذیرد.

۱-۱-۵- انتقال گاز

عملکرد اساسی سیستم انتقال گاز برای برآورده کردن نیازهای متابولیسمی سلول بوسیله اکسیژن و زدودن محصولات دفعی مانند دی اکسید کربن است. این هدف در مرحله اول بوسیله گردش خون بدست می آید. سازگاری اصلی خون برای انتقال گازهای تنفسی وجود رنگدانه تنفسی هموگلوبین است که در سلول های قرمز خون وجود دارد. هموگلوبین نه تنها ظرفیت حمل اکسیژن خون را در مقایسه با حمل فیزیکی آن زیاد می کند، بلکه توانایی هموگلوبین در اتصال به پروتون و همچنین حمل دی اکسید کربن در خون را افزایش می دهد.

ظرفیت حمل اکسیژن خون ماهیان، شامل اکسیژنی است که به صورت محلول انتقال می یابد و همچنین اکسیژنی که به صورت ترکیب با هموگلوبین، در داخل گلبول های قرمز وجود دارد. ۹۳ درصد از اکسیژنی که توسط خون حمل می شود، به طور قابل برگشت با هموگلوبین ترکیب می گردد. در حالی که ۷ درصد به طور فیزیکی در پلاسما، در حالت اشباع حل می شود. در محیط های سردتر، سهم پلاسما افزایش می یابد [ستاری، ۱۳۸۱]. همانطور که قبلاً ذکر شد، در ماهیان قطب جنوب (خانواده Chaenichtyidae) هموگلوبین خون، بسیار کم و یا اصلاً وجود ندارد و در دمای ۱/۵- درجه ۱۲ درصد اکسیژن در پلاسما حل می شود.

[1] Hagfish
[2] Beta-adrenergic

۱-۱-۵-۱- ساختار هموگلوبین

از جمله پروتئین هایی که بسیار مورد مطالعه قرار گرفته، هموگلوبین است [Perutz, 1984]. توانایی متابولیسم هوازی جانوران برای برطرف کردن نیازهایشان تنها به علت نقش پروتئینهایی مانند هموگلوبین است که انتقال مقادیر زیاد اکسیژن را به بافت ها میسر می سازد [Giardina et al., 2004]. در مهره داران مولکول هموگلوبین از زنجیره های پلی پپتیدی ساخته شده است که به گلوبین[1] معروفند و هر کدام از آنها گروه پروستاتیکی به نام هِم[2] دارند. گروه هم در همه ماهیان مشابه است. در مقابل گلوبین ها از گونه ای به گونه دیگر متفاوت هستند. هموگلوبین ماهیان عالی تترامریک است، که شامل چهار زنجیره گلوبین بوده و تترامر پایداری شامل دو زنجیره آلفا و دو زنجیره بتا به ترتیب با ۱٤۱ و ۱٤٦ واحد اسید آمینه را تشکیل می دهند.

این نوع هموگلوبین تقریباً وزن مولکولی ٦٥۰۰۰ دالتون دارد. هموگلوبین مونومریک مشخصه لامپری ها و هگ فیش ها است. ماهیان به طور کلی با شرایط محیطی متغیری در مقایسه با جانوران خشکی زی مواجه هستند. از این رو انواع مختلفی از هموگلوبین تترامریک وجود دارد که ممکن است چندین نوع آن در یک ماهی یافت شود. این سازشی برای برآورده کردن نیازهای متابولیکی ماهیان با محیط ها و شرایط مختلف زندگی می باشد [Glomski, 1997].

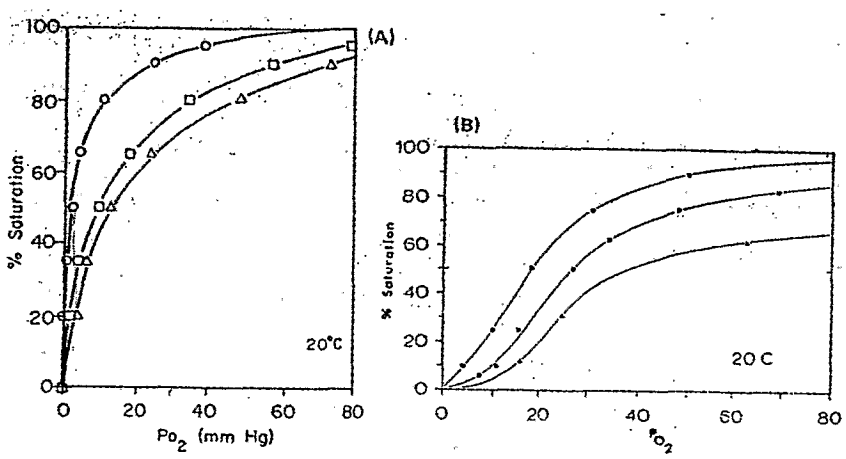
وجود هموگلوبین های مختلف از خصوصیات تطابقی گونه های ماهیان مهاجر است که دگرگونی های محیطی قابل توجهی را تجربه می کنند. برای مثال، مارماهی آمریکایی کاتادرموس (دریا کوچ) دارای نوعی هموگلوبین است که میل ترکیبی بیشتری با اکسیژن در آب شور دارد. درحالیکه میل ترکیبی نوع دیگر، در آب شیرین زیاد است [Poluhowich, 1972].

۱-۱-۵-۲- میل ترکیبی اکسیژن

عملکرد مهم هموگلوبین انتقال اکسیژن از اندام های تبادل گاز به بافتها است. هموگلوبین باید قادر به اتصال اکسیژن باشد. اما در همان زمان باید اکسیژن را زمانی که مورد نیاز است، آزاد کند. این آزاد کردن بسته به فشار نسبی گاز دارد [Perutz, 1978]. اتصال برگشت پذیر اکسیژن، به علت گروه هِم است. این اتصال بوسیله حضور اتم آهن به شکل Fe^{2+} صورت می گیرد.

[1] Globin
[2] Heme

منحنی جدایی اکسیژن خون اغلب ماهیان منحنی های غیر خطی با ساختار سیگموئیدی (به خصوص در ماهیان فعال) است و نشان دهنده میانکنش بین چهار زیر واحد گلوبین می باشد [Bone, 2007]. این منحنی بیان کننده تمایل بالا به اکسیژن در زمان جذب آن در آبشش و تمایل کم به اکسیژن برای رها کردن اکسیژن در نزدیکی بافت ها می باشد. شیب این منحنی می تواند در پاسخ به تغییرات pH خون تغییر کند. بدین معنی که با اسیدی شدن محیط منحنی به سمت راست تغییر می کند (اثر بور) و در مقابل منحنی های شبه هذلولی (برای مثال منحنی جدایی اکسیژن خون ماهی سیاه[1]) است که از فقدان میانکنش بین چهار زیر واحد مولکول های هم ناشی می شود که میل ترکیبی بالاتری به اکسیژن را نشان می دهد [ستاری، ۱۳۸۱](تصویر ۱-۱).



شکل ۱-۱ : A: منحنی تفکیکی اکسیژن خون برای ماهی سیاه ساکرامانتو که با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به حالت تعادل در آمده است. B: منحنی تفکیکی برای قزل آلای رنگین کمان که با دمای ۲۰ درجه به حالت تعادل در آمده است [ستاری، ۱۳۸۱].

این ویژگی مزیت ماهیانی است که در آبی که از نظر اکسیژن فقیر است زندگی می کنند (ماهی سیاه). زیرا در فشارهای پایین هموگلوبین آنها می تواند به اشباعیت بالاتری با اکسیژن برسد. همانطوری که در شکل ۱-۱ می بینید، A منحنی تفکیکی اکسیژن خون ماهی سیاه در فشار اکسیژن معادل ۲ میلی متر جیوه است که در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد ترسیم شده است. فشار ۲ میلی متر جیوه را ارزش نیم اشباع (P_{50}) می نامند. در مقایسه با خون قزل آلای رنگین کمان، خون ماهی سیاه P_{50} (۲میلیمتر جیوه) پایین تری دارد که این خصوصیت میل ترکیبی بالاتری را نشان می دهد [ستاری، ۱۳۸۱].

[1] Ortodon microlepidotus