

بررسی تغییرات هیستومتریک بافت‌های کلیه بچه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در پاسخ به شوری های مختلف محیطی

عبدالعلی موحدی نیا*، هاجر پایی

استادیار، دانش‌آموختگان گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی
خرمشهر

چکیده

به منظور بررسی تغییرات هیستومتریک توپول‌های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)، ۶۴۰ قطعه بچه ماهی (میانگین وزنی 0.7 ± 4 و طول متوسط 0.5 ± 4 گرم) در دوره ۵۶ روزه آزمایش قرار گرفتند. نمونه برداری در روزهای ۱، ۱۴، ۲۸ و ۵۶ صورت گرفت که بطور همزمان و ۶۰ ppt) در هر تانک (۱۲ ماهی از هر تیمار) در هر بار انجام شد. نمونه‌ها در بوئن تثبیت شده و پس از انجام مراحل معمول تهیه مقاطع بافتی، مقاطع بافتی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسین-ائوزین رنگ آمیزی شد. اندازه‌گیری‌های شاخص‌های بافتی مختلف در مقاطع میکروسکوپی از تبدیل لنز دیجیتال Dinolite برای تهیه عکس و از نرم‌افزار همراه آن (Dinocapture) برای اندازه‌گیری استفاده شد. بررسی قطر دیواره لوله‌های کلیوی در تمامی بخش‌های هادر شوری‌های مختلف طی دوره آزمایش تفاوت معنی‌داری نشان نداد. قطر لومن توپول پروکسیمال ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوری‌ها، در مواجهه با شوری ۱۰ ppt و افزایش یافت که در زمان‌های بعدی نمونه برداری به حالت عادی برگشت. در روز ۱ قطر لومن توپول دیستال در شوری ۱۰ ppt نسبت به تیمار کنترل کاهش معنی‌داری داشت در حالی که در روز ۱۴ در شوری ۶۰ ppt افزایش معنی‌داری نشان داد و در طی سازگاری به مقادیر اولیه و کنترل برگشت. این ماهی توانست علاوه بر تحمل شوری‌های بالاتر و پایین‌تر از آب دریا به خوبی خود را با زندگی در این محیط‌ها سازگار کند و طی یک هفته عادی شاخص‌های تغییر یافته به حالت عادی برگشت.

کلمات کلیدی: تنظیم اسمزی، کلیه، هامور معمولی، *Epinephelus coioides*

مقدمه

از جمله عوامل تاثیرگذار بر حیات، سوخت و ساز و پراکنش آبزیان، شوری است که فرآیندهای رشد و نمو موجود را تحت تاثیر قرار می دهد. ماندگاری جانور در یک محیط، به توانایی اسمزی آن موجود در تطابق با شوری محیطی که در آن زندگی می کند (Varsamoset et al., 2005). آبشش، کلیه، روده و پوست از مهمترین اندام های مرتبط با تنظیم اسمزی هستند که در این بین کلیه با ترشح یون های دو ظرفیتی و نگهداری آب بدن در آب شور و بازجذب یون های تک ظرفیتی و دفع آب اضافی بدن در آب شیرین نقش مهمی دارد. برای زندگی در آب شور و شیرین، ساختار کلیه برای توانایی انجام کارهای مختلف در هر کدام از محیط ها تغییر می کند (Evans, 1999). هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) از خانواده ی Serranidae، یکی از گونه های مهم و تجارتي خلیج فارس به حساب می آید که ارتباط تنگاتنگ با آبهای مصبی و خوریات دارند. به طور گسترده ای این ماهی در نواحی ساحلی اقیانوس های معتدل، گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان یافت می شود. یوری هالین^۱ و یوری ترم^۲ نوع بالغ این ماهی هستند که محل اصلی زندگی این ماهی ها نواحی ساحلی است (معاذی، ۱۳۸۶). هدف از انجام این پژوهش در واقع بررسی دامنه تحمل شوری در بچه ماهی هامور و بررسی تغییرات مورفومتریک توبول های کلیوی در شوری های مختلف در این ماهی است.

مواد و روش ها

۶۴۰ قطعه ماهی هامور معمولی با میانگین وزنی 4 ± 0.7 و طول متوسط 4 ± 0.5 گرم در تابستان سال ۱۳۸۸ از مرکز تحقیقات شیلات واحد بندر امام خمینی (ره) و ماهشهر تهیه شد. ماهیان به ۱۶ تانک ۳۰۰ لیتری محتوی آب دریا (هر تانک ۴۰ قطعه ماهی) برای مدت یک هفته به منظور سازگاری با شرایط جدید (سوله ی پژوهشی مورد نظر) انتقال داده شدند. شرایط محیطی شامل دما و نور در طول پروژه برای تمامی تانک ها یکنواخت بود. در این پروژه شوری های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ گرم در لیتر (ppt) در نظر گرفته شد. در طول مدت آزمایش سنجش ویژگی های فیزیکی شیمیایی آب از قبیل شوری، دما، pH و اکسیژن محلول به طور روزانه اندازه گیری می شد. برای تغذیه ی ماهی ها در طول دوره ی سازگاری و طی انجام پروژه از بیومار استفاده شد ترکیب این غذا شامل ٪ پروتئین، ۱۸٪ چربی، ۳۰٪ کربوهیدرات، ۹٪ فیبر بود. غذاهای به ماهی در دو نوبت صبح و بعد از ظهر انجام شد. تعویض آب تانک ها به صورت روزانه و پس از اتمام تغذیه برای جلوگیری

^۱.Euryhaline

^۲. Eurytherm

از افزایش آمونیاک و حاصل های سوخت و سازی دیگر انجام شد (Altinok et al., 1998). طول دوره ی آزمایش ۵۶ روز طراحی شد و نمونه برداری در روزهای ۱، ۱۴، ۲۸ و ۵۶ صورت گرفت که به طور همزمان و ۳ ماهی از هر تانک (۱۲ ماهی از هر تیمار) در هر بار انجام شد که ماهیان به صورت تصادفی صید و با گل میخک بود بیهوش می شدند. پس از جداسازی کلیه ها، نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن (۷۵ میلی لیتر محلول اسید پیکریک اشباع، ۲۵ میلی لیتر فرمالدهید ۳۷٪ و ۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال) تثبیت شد (موحدي نيا، ۱۳۸۸). برای انجام مرحله آبیگری از نمونه های بافتی سری های افزایشی اتانول (۰/۷۰٪، ۰/۸۰٪، ۰/۹۰٪ و ۱/۰۰٪)، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در داخل محلول زایلن - الکل (۰/۵۰ - ۰/۵۰٪) عبور داده شدند. در فاصله ی زمانی بین انتقال نمونه ها از آخرین محلول آبیگری (الکل) به محلول زایلن، نمونه ها قرار گرفتند. برای الکل گیری و شفاف سازی بافت از زایلن (دو زمان ۱/۵ ساعته در دو محلول) استفاده شد عمل پارافین دهی در دو مرحله که طول هر مرحله ۳ ساعت بود با استفاده از پارافین (Merck) انجام شد. مراحل آبیگری، شفاف کردن و آغشتگی به پارافین با دستگاه هیستوکینت مدل Tissue tek-rotary, RX 11B ساخت کشور ژاپن، در آزمایشگاه بافت شناسی انجام شد. بعد از اتمام این مرحله قالب گیری، برش هایی سریالی از کلیه به ضخامت ۶-۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم نیمه دیجیتال LEICA مدل RM2245 ساخت کشور آلمان تهیه شد. سپس لام های تهیه شده با همتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی می شوند. برای اندازه گیری های شاخص - های بافتی مختلف در مقاطع میکروسکوپی از تبدیل لنز دیجیتال Dinolite برای تهیه عکس و از نرم افزار همراه آن (Dinocapture) برای اندازه گیری استفاده شد. تغییرات مورفومتریک توبول های کلیوی در شوری های مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One Way Anova) در نرم افزار SPSS 16 و پس آزمون Duncan برای بررسی داده ها استفاده شد. اختلاف در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد پذیرش قرار گرفت. برای رسم نمودار از نرم افزار Microsoft Office Excel 2007 استفاده شد.

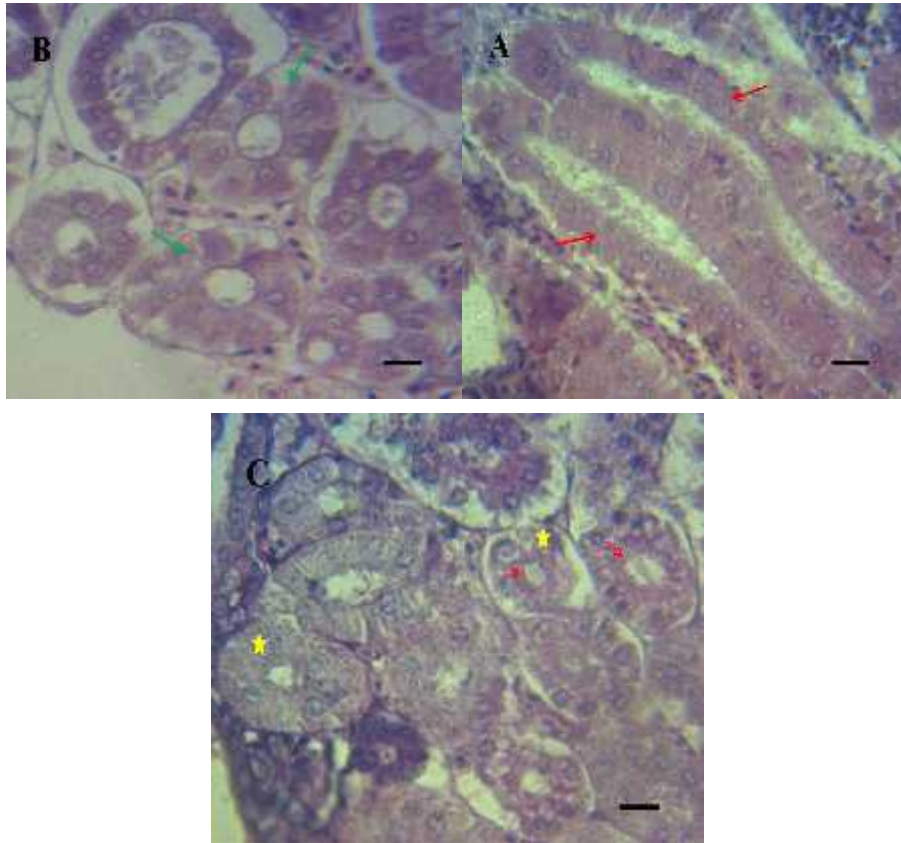
نتایج

بررسی تغییرات قطر دیواره لوله های کلیوی

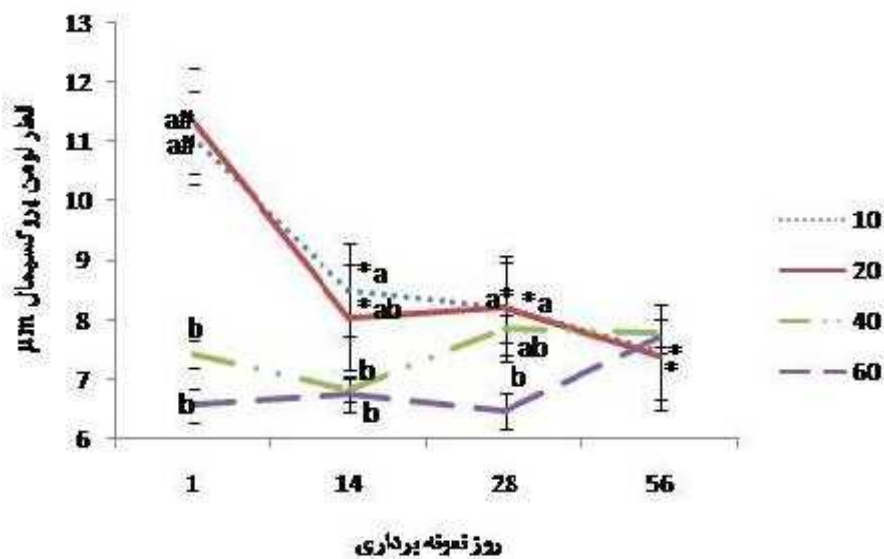
بررسی قطر دیواره توبول دیستال و دیواره توبول پروکسیمال در شوری های مختلف طی دوره آزمایش در زمان های مختلف تفاوت معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$).

بررسی تغییرات قطر لومن توبول پروکسیمال

بافت شناسی قسمتهای مختلف لوله های کلیوی بچه هامور معمولی در شکل ۱ نشان داده شده است. قطر لومن پروکسیمال ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری در مواجهه با شوری های ۱۰ و ۲۰ ppt، افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$) که بلافاصله در روزهای بعدی به حالت عادی برگشت (شکل ۲).



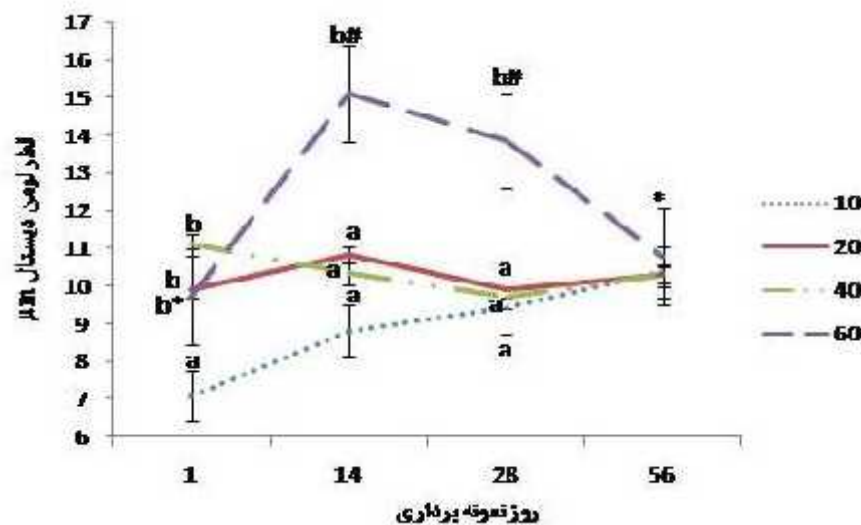
شکل ۱. A: تصویر میکروسکوپ نوری لوله های جمع کننده ی ادراری بچه هامور معمولی. فیکساتیو بوئن، H & E (فلش: توبول جمع کننده ادراری، خط مقیاس ۲۰ μm). B: تصویر میکروسکوپ نوری توبول دیستال بچه هامور معمولی. فیکساتیو بوئن، H & E (فلش: توبول دیستال، خط مقیاس ۲۰ μm). C: تصویر میکروسکوپ نوری از توبول پروکسیمال بچه ماهی هامور معمولی، فیکساتیو بوئن، H & E. (فلش: توبول پروکسیمال، پیکان خط چین: حاشیه مسواکی، خط مقیاس ۲۰ μm)



شکل ۲. تغییرات اندازه قطر لومن توبول پروکسیمال در هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) سازش یافته با شوریه های مختلف محیطی. حروف متفاوت (a,b,c) نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف در هر زمان می باشد. #،* نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در هر تیمار در روزهای مختلف است.

بررسی تغییرات قطر لومن توبول دیستال

قطر لومن توبول دیستال در بچه ماهی هامور معمولی در روز نخست در شوریه ۱۰ ppt نسبت به نمونه های کنترل کاهش معنی داری نشان داد، همچنین در روز ۱۴، پس از مواجهه با شوریه ۶۰ ppt، قطر لومن دیستال افزایش یافت که طی سازگاری به مقادیر اولیه و کنترل برگشت ($P < 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳. تغییرات قطر توبول دیستال در هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) سازش یافته با شوری های مختلف محیطی. حروف متفاوت (a,b,c) نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف در هر زمان می باشد. #،* نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار در هر تیمار در روزهای مختلف می باشد.

بحث

در بررسی قطر دیواره لوله های کلیوی (توبول پروکسیمال و توبول دیستال) در شوری های مختلف مورد آزمایش در زمان های مختلف نمونه برداری تفاوت معنی داری مشاهده نشد که ممکن است تغییر در تعداد توبول های کلیوی در بافت کلیه ی این ماهی دلیل بر عدم تغییر قطر دیواره توبول های کلیوی باشد. قطر دیواره و قطر لومن داخلی توبول های جمع کننده ادراریماهی کپور معمولی در مطالعات هیستومتریک مجاری جمع کننده ادراری در پاسخ به شوری های مختلف اختلاف معنی داری نشان داد در حالی که تعداد این توبول ها تغییر یافت (عزیزی، ۱۳۸۷). این تغییرات می تواند با کاهش نیاز مجاری جمع کننده به نفوذپذیری آب و تسهیل ترشح ادرار رقیق شوری های پایین در ارتباط باشد (Tsunekiet al., 1984). عدم تغییر در قطر دیواره توبول های کلیوی در پژوهشی که روی ماهی زورک سازش یافته به شوری های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ppt انجام گرفت گزارش شد (چناری و همکاران، ۱۳۸۷). در ماهی شانک نقره ای سازگار شده به شوری های مختلف محیطی قطر لومن، ضخامت دیواره و تعداد لوله های جمع کننده در شوری های ۶ و ۱۲ppt نسبت به شوری ۵ و ۳۳ppt افزایش معنی داری در لوله های جمع کننده نشان داد (Wong and Woo,)

2006)، که این افزایش در دیواره را دلیل بر افزایش جریان ادرار در مجرای مزونفریک و تسهیل در دفع ادرار بیان کردند که با نتایج Townsely و Scott (۱۹۶۳) با پژوهش روی ماهی *Pleuronectes platessa* مطابقت داشت. قطر لومن توبول پروکسیمال در شوری ۱۰ و ۲۰ ppt در ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوری افزایش یافت و در روزهای بعدی به حالت عادی بازگشت. ورود ماهی به محیط هایپواسمیتیک و ورود حجم زیاد آب و کشیدگی بیشتر لومن می تواند از دلایل این افزایش قطر باشد (Tsuneki et al., 1984) که ممکن است بتدریج با فعال شدن ساز و کارهای مختلف تنظیم اسمزی مانند کاهش در میزان نوشیدن آب، تغییر در نفوذپذیری پوست، برداشت فعال یون ها در حفره آبششی و همچنین سرعت زیاد جریان صاف کردن در نفرون ها و تغییر در تعداد نفرون های تصفیه کننده موجب بازگشت قطر لومن توبول پروکسیمال به حالت عادی شود. توبول های کلیوی برای سازگاری با شرایط هایپواسمیتیک تغییرات موفولوژی سریعی نشان می دهد، تغییرات ساختاری و بافتی مرحله‌ی تدریجی در شرایط اسمزی نیست (Wong and Woo, 2006). در پژوهشی که روی ماهی شیرین *Etroplus maculatus* طی قرار گرفتن در شوری های ۳۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ ppt انجام شد مشاهده شد که قطر لومن بافت لومن بافت کلیه کاهش معنی داری نشان داد که طی سازگاری، قطر لومن به مقادیر اندازه گیری در آب شیرین بازگشت (Virabaracha, 1962). کاهش در قطر لومن را Smith (۱۹۳۱) را به دلیل کاهش در میزان صاف کردن گلومرولی بیان کرد. قطر لومن توبول دیستال در ماهی ۱۴ روز پس از مواجهه با شوری ۶۰ ppt، افزایش نشان داد طی سازگاری به مقادیر اولیه و کنترل برگشت. که این افزایش احتمالا به علت احتیاج ماهی به دفع یون از راه این مجاری، کاهش در میزان صاف کردن گلومرولی و افزایش در نفوذپذیری آب در توبول های دیستال و توبول های جمع کننده ادراری است. در بررسی کلیه لامپری رودخانه ای *Lamprey lamperta* سازش یافته با آب شور، در ماهی سازش یافته با ۵۰٪ آب دریا نسبت به همین ماهی در آب شیرین، میزان تولید ادرار کاهش یافت که این کاهش با کاهش میزان صاف کردن گلومرولی و افزایش بازجذب آب مرتبط بود (Logan et al., 1980). در روز نخست شوری ۱۰ ppt نسبت به نمونه های کنترل کاهش معنی داری داشته که در زمان های بعدی نمونه گیری در تمامی شوری ها تفاوت معنی داری مشاهده شد که علت این تغییرات در بافت کلیه ماهی ممکن است به علت کاهش نفوذپذیری آب، افزایش جذب یون ها و کاهش شدید در دفع یون ها در این توبول ها باشد (Evans et al., 1993).

منابع

۱. چناری، ف.، ۱۳۸۷. مطالعه تغییرات بافتی در کلیه ماهی زروک *Scatophagus argus* در پاسخ به شوری های مختلف، پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۷۳ صفحه.
۲. عزیزی، ن.، ۱۳۸۷. تأثیر درجات مختلف شوری بر تغییرات بافتی آبشش و کلیه ی کپور معمولی *Cyprinus carpio*، پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی شیلات، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۱۱۴ صفحه.
۳. موحدی نیا، ع.، ۱۳۸۸. مکانیسم های تنظیم اسمزی در ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus Latus*) مطالعه ی اکولوژیکی، بافت شناختی و فراساختاری آبشش. پایان نامه ی دکتری رشته ی بیولوژی جانوران، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۱۲۳ صفحه.
۴. معاضدی، ج.، ۱۳۸۶. تکثیر و پرورش مصنوعی ماهی هامور *Epinephelus ssp.* بررسی مقدماتی تکثیر ماهی هامور در قفس (در خوریات ماهشهر). گزارش سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، با شماره ثبت ۸۵/۲۲۷.
5. Altinok I, Galli SM, and Chapman FA. (1998). Ionic and osmotic regulation capabilities of juvenile Gulf of Mexico sturgeon, *Acipenser oxyrinchus* de sotoi. *Comparative Biochemical and Physiology*, 120: 609-616.
6. Evans DH, Piermarini PM, and Potts WTW. (1999). Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*, 283: 641-652.
7. Evans DH. (1993). Osmotic and ionic regulation. In: *The physiology of fishes.*, D.H.Evans (Ed.). p:315-342.
8. Logan AG, Moriarty RJ, and Rankin JC. (1980). Micropuncture study of kidney function in the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*), adapted to fresh water. *Journal of Experimental and Biology*, 85: 137-147.
9. Smith HW. (1931). The absorption and excretion of water and salts by elasmobranch fishes, *Amer. Journal of Physiology.*, 98: 296 -310.
10. Townsely PM, and Scott MA. (1963). Systolic muscular action of the kidney tubules of flounder. *Journal of Fish Research*, 20: 243-244.
11. Tsueki K, Kobayashi H, and Pang PKT. (1984). Electron-microscopic study of innervation smooth muscle cells surrounding collecting tubules of fish kidney. *Cell and Tissue Research*, 238:307-312.
12. Varsamos S, Nebel C, and Charmantier G. (2005). Ontogeny of osmoregulation in fish: a Comparative review. *Biochemical and Physiology*, 141: 401-429.
13. Virabadrachari V. (1961). Structural changes in gills, intestine, and kidney *Eetroplus maculatus* adapted to different salinities (from the department of zoology, Sir Venkateswara University, Tirupati, Andhra Pradesh, Indian).
14. Wong MKS, and Woo NYS. (2006). Changes in renal morphometrics in silver sea bream (*Sparus sarba*) on exposure to different salinities. *Journal of Fish Biology*, 69: 770-782.

Aquatic Physiology and
Biotechnology
Vol. 1 No. 1, Fall 2013

Renal histometrical alterations in juvenile Orange spotted Grouper, *Epinephelus coioides*, in response to different environmental salinities

Abdolali Movahedinia*, Hajar Papi

MSc, MSc and Assistant Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology

Abstract

To investigate histometrical changes in renal tubules of Orange spotted Grouper, *Epinephelus coioides*, 640 juvenile individuals ($4\pm 0.7g$, $4\pm 0.5mm$) were exposed to different environmental salinities (5, 20, 40 and 60 ppt) for a period of 56 days. At each sampling time (day 1, 14, 28 and 56) 3 fish from each tank (9 fish per treatment) were sampled. Samples were fixed in Bouin's solution and following routine histological procedure, $5\mu m$ sections were stained using Hematoxylin and Eosin. Histomorphometrical indices in kidneys were evaluated in microscopic sections. Wall thickness of renal tubules showed no changes in different salinities up to the end of the experimental period. Lumen diameter in proximal tubule was increased in 10 and 20 ppt 24 hours after changing in salinity, but it returned to the control size at the next sampling times. Lumen diameter in distal tubule in 10 ppt decreased at day 1 but it increased in 60ppt at day 14. Orange spotted Grouper successfully adapted to lower and higher salinities than sea water and alterations in renal tubules returned to the normal conditions during the first week from the beginning of salinity stress.

Keywords: Osmoregulation, Ecophysiology, Kidney, Orange spotted Grouper, *Epinephelus coioides*

*amovahedinia@yahoo.com

