

تأثیر شوک اسمزی بر برخی پارامترهای فیزیولوژیک در بچه ماهیان سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*)

فاطمه فداکار ماسوله^۱، باقر مجازی امیری^{۲*}، علیرضا میرواقفی^۱، حسین غفوری^۳

۱. دانش آموخته دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۰/۳

چکیده

در این مطالعه برخی پارامترهای مرتبط با تنظیم اسمزی در بچه ماهیان سفید پس از ورود ناگهانی به شوری ۶ و ۱۱ گرم در هزار مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان به ارزیابی محل مناسب رهاسازی بچه ماهیان سفید پس از تکثیر مصنوعی پرداخت. از کل بدن و همچنین آبشش بچه ماهیان پس از تماس با شوری، در ساعات ۲۴، ۷۲ و ۱۶۸ جهت سنجش فاکتورهای مختلف نمونه برداری صورت گرفت. میزان آنزیم $Na^+/K^+ATPase$ در شوری ۶، در ساعت ۲۴ با تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.05$) و سپس با روند نزولی هیچ گونه تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت ($P > 0.05$). در گروه دوم نیز میزان این آنزیم در ساعت ۲۴ به حداکثر میزان خود رسید و سپس کاهش یافت، اما در تمامی ساعات نسبت به گروه کنترل با تفاوت معنی دار افزایش داشت ($P < 0.05$). میزان پروتئین در شوری ۶ هیچ گونه تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت ($P > 0.05$)، اما در پایان دوره تماس در شوری ۱۱ میزان آنزیم با تفاوت معنی دار کاهش یافت ($P < 0.05$). غلظت RNA نیز در شوری ۶ هیچ گونه تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت ($P > 0.05$)، اما در پایان دوره تماس در شوری ۱۱ میزان این آنزیم با تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.05$). درصد اسمولاریته پلاسما نیز در هر دو گروه با تفاوت معنی دار نسبت به زمان صفر افزایش یافت ($P < 0.05$). درصد تلفات در گروه دوم تنها $1/52 \pm 7/33$ درصد بود در حالی که در شوری ۶ هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد. درصد آب بدن نیز با افزایش شوری به صورت معنی دار کاهش یافت ($P < 0.05$). با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش، به نظر می رسد رهاسازی بچه ماهیان در محیطهای مجاور دریای خزر و با شوری بیشتر، به جهت گریز از حجم عظیم آلاینده های موجود در مصب، مشکل حادی برای بچه ماهیان پیش نخواهد آورد.

واژگان کلیدی: تنظیم اسمزی، شوری، آنزیم $Na^+/K^+ATPase$ ، RNA، بچه ماهی سفید.

۱. مقدمه

تنظیم اسمزی در ماهیان شامل تغییر شکل، رفتار و فیزیولوژی پس از ورود به محیط جدید با شوری متفاوت می‌باشد (McCormick and Saunders, 1987) که توسط گروهی از ساختارها مانند آبشش، کلیه، بافت پوششی روده و معده (Gastrointestinal epithelium)، به‌عنوان اساسی‌ترین مکان تعادل و جابجایی یون‌ها صورت می‌پذیرد (Evans, 1993). ماهیان یوری‌هالین به‌دلیل تحمل شوری در دامنه‌ی گسترده، ماهیان مناسبی جهت مطالعات تنظیم اسمزی محسوب می‌شوند. لایه اپیتلیومی آبشش حاوی سلول‌های ویژه‌ای موسوم به سلول‌های کلراید است که از سیستم آنزیمی Na^+/K^+ ATPase جهت تنظیم تبادل دو طرفه یون‌های سدیم و کلر در آب شیرین و شور استفاده می‌کنند (Wilson and Laurent, 2002). این آنزیم ۲ یون پتاسیم خارج سلولی را به ازای ۳ یون سدیم داخل سلولی با استفاده از هیدرولیز یک مولکول ATP معاوضه می‌کند (Jagoe et al., 1996). در واقع فعالیت این آنزیم مرتبط با میزان عملکرد آبشش در ترشح یون به محیط با فشار اسمزی بیشتر (McCormick, 2001) و جذب یون‌ها در محیط با فشار اسمزی کمتر می‌باشد (Jensen et al., 1998). زمانی که شوری محیط با فشار اسمزی داخل بدن متفاوت باشد، مانند زمانی که تغییر محیط از آب شیرین به آب شور رخ می‌دهد، ماهیان دچار استرس اسمزی (Hyper osmotic stress) شده و بلافاصله با افزایش غلظت یون‌ها و از دست دادن آب بافتی (Tissue dehydration) مواجه خواهند شد (Blackburn and Clarke, 1987). این امر موجب تحمیل مصرف انرژی توسط ماهی برای نقل و انتقال فعال یون‌ها خواهد شد. البته این قابلیت سازگاری در سنین و اندازه‌های مختلف ماهی متفاوت است (Zydlewski and McCormick, 1997). تمام مطالعاتی که در زمینه تنظیم اسمزی انجام گرفته است بر رابطه مستقیم شوری محیط و فعالیت آنزیم Na^+/K^+ ATPase تاکید دارند. این رابطه‌ی مستقیم در آزاد ماهیان و مارماهیان مثبت و در بعضی همچون شانک ماهی، شاه ماهی و فلاندرها منفی عنوان شده است (Lin et al., 2003).

پروتئین کل یک شاخص کلینیکی برای آگاهی از میزان سلامتی و وضعیت استرس گونه‌های آبی محسوب می‌شود. کاهش پروتئین و کاهش غلظت RNA که خود نیز نشان از کاهش سنتز پروتئین می‌باشد به‌عنوان تغییرات ژنتیکی حاصل از استرس ماهیان مطرح می‌باشند (Prunet et al., 2008). شاخص تلفات نیز از دیرباز به‌عنوان یکی از شاخص‌های اساسی تحمل ماهیان در مقابل استرس‌های مختلف مدنظر قرار گرفته است (Rudneva, 2014). یکی از ماهیانی که در برنامه بازسازی ذخائر دریای خزر در ایران قرار دارد، ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) است. در شرایط طبیعی بچه ماهیان سفید پس از رسیدن به مرحله انگشت قد با عبور از رودخانه، گذر از مصب و رسیدن به دریا ناگزیر به انجام تغییرات فیزیولوژیک جهت تنظیم تعادل اسمزی خود می‌باشند و به جهت این سیر تدریجی قادر خواهند بود با صرف حداقل انرژی تنظیم اسمزی را به بهترین نحو انجام دهند. اما با توجه به عدم وجود تکثیر طبیعی ماهیان سفید و وجود تنها تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان و ورود ناگهانی آن‌ها به محیط مصب مطالعه شاخص‌های اساسی در تنظیم اسمزی به دنبال تغییرات سریع شوری از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. همچنین محیط مصب مکان اصلی تجمع موادی است که توسط رودخانه‌ها به این ناحیه آورده شده‌اند، این مواد حاوی انواع ترکیبات آلی و شیمیایی است که هر کدام به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر منشا ایجاد استرس برای بچه ماهیان رهاسازی شده خواهند بود. بنابراین بچه ماهیان به اجبار علاوه بر تلاش برای مقاومت در برابر ورود ناگهانی به محیط با شوری متفاوت باید خود را در برابر حجم عظیم آلاینده‌های موجود در مصب نیز آماده سازند، زیرا در این محیط با فشاری مضاعف مواجه خواهند شد. بنابراین شاید رهاسازی این بچه ماهیان در محیطی به دور از مصب بتواند آنان را از این فشار مهلک نجات بخشد و این میسر نخواهد بود مگر این‌که به مطالعه کلیه‌ی پاسخ‌های فیزیولوژیک بچه ماهیان سفید در ارتباط با شوری‌های متعدد بپردازیم.

در سال‌های گذشته مطالعاتی در رابطه با تاثیر شوری‌های مختلف بر رشد و ماندگاری و میزان املاح بچه ماهیان سفید صورت گرفته است (Amiri et al.,

اساس سنجش این آنزیم میزان جذب ATP در ۳۴۰ نانومتر است. آنزیم ATPase در حضور سوستررا یک مول ATP را به یک مول NAD^+ تبدیل کرده و از غلظت ATP کاسته می‌شود. بنابراین شیب منفی حاصل از نمودار ترسیم شده اساس محاسبه خواهد بود.

۱.۱.۲. روش سنجش

جهت همگن کردن نمونه‌ها، تکه‌ای از آبشش را در ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر SEIDM (Sucrose, EDTA, Imidazole, Deoxycholate, Mercaptoethanol) ریخته و با هوموژنایزر بافت را کاملاً همگن می‌نماییم. پس از جداسازی مایع رویی، آن را جهت سنجش آنزیم در یخ نگه می‌داریم. اندازه‌گیری میزان آنزیم باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از آماده سازی هوموژنات صورت گیرد. برای سنجش آنزیم ۷۰ میکرولیتر از محلول نمکی (NaCl ۱۸۰ میلی مولار، $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۱۰ میلی مولار، KCl ۴۰ میلی مولار در محلول ایمیدازول (pH=۷/۵) به همراه ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اصلی حاوی سوستررا و بدون سوستررا (+Ouabain و -Ouabain) و ۱۰ میکرولیتر هوموژناتبا هم مخلوط شده و بلافاصله جذب توسط دستگاه میکروپلیت الیزا ریدر و با نرم‌افزار Soft Max pro در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد و میزان فعالیت آنزیم با محاسبه شیب منحنی به دست آمده محاسبه گردید (Bergmeyer, 1974). هر نمونه هوموژنات سه مرتبه مورد سنجش قرار گرفت. تعداد نمونه آبشش استفاده شده در هر تیمار سنجش آنزیم (n=۱۰) بود.

۲.۲. سنجش پروتئین

جهت سنجش میزان پروتئین بافت نیز از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده شد. تعداد نمونه آبشش استفاده شده در هر تیمار سنجش پروتئین (n=۱۵) در نظر گرفته شد.

۳.۲. سنجش غلظت RNA

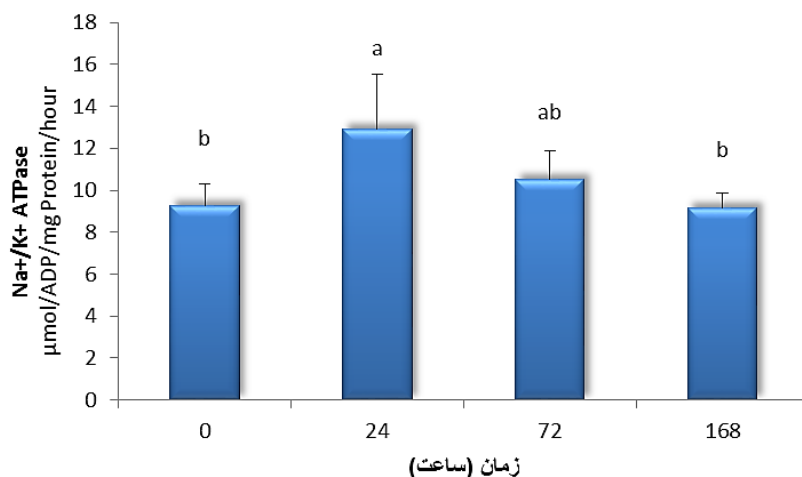
۱۵۰ میلی‌گرم از بافت آبشش را به همراه ۱ میلی‌لیتر از محلول TRIsure (Bioline, USA) در تیوب مخصوص قرار داده شد و با هوموژنایزر به مدت

اما تاکنون در ارتباط با فاکتورهای بیوشیمیایی و مولکولی مرتبط با تنظیم اسمزی بچه‌ماهیان سفید مطالعه‌ای صورت نگرفته است، این مطالعه نیز با تاکید بر فاکتورهای مذکور، میزان سازگاری بچه ماهیان سفید به‌عنوان اقتصادی‌ترین و مهم‌ترین ماهی دریای خزر را دقیق‌تر مورد مطالعه قرار داده تا شمای کامل‌تری از روند تنظیم اسمزی بچه ماهیان سفید تحت مواجهه با شوک اسمزی به‌دست آید.

۲. مواد و روش‌ها

بچه‌ماهیان سفید به وزن 0.12 ± 0.096 گرم و طول 4.30 ± 0.36 سانتی‌متر پس از تهیه به آزمایشگاه شیلات دانشگاه تهران منتقل شدند و پس از گذشت دو هفته سازگاری با شرایط فیزیکی و شیمیایی جدید آزمایشگاه، جهت تیمار بندی به مخازن ۱۰۰ لیتری با شوری ۶ و ۱۱ ppt انتقال داده شدند. بچه ماهیان در طول این دوره با غذای دستی شرکت چینه ایران به نسبت ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند و ۲۴ ساعت پیش از شروع آزمایش غذایی متوقف شد. از آبشش بچه ماهیان پس از تماس با شوری ۶ و ۱۱ ppt در ساعات ۲۴، ۷۲ و ۱۶۸ پس از بیهوشی به‌وسیله پودر گل میخک با غلظت ۲۰ ppm، به‌طور تصادفی نمونه برداری شد. ابتدا تکه‌ای از فیلامنت‌های دومین کمان آبششی جهت سنجش آنزیم در محلول SEI (Sucrose, EDTA, Imidazole) (pH=۷/۱) (Zaugg, 1982) قرار داده شد و تکه‌ای از فیلامنت‌های دومین کمان نیز جهت سنجش میزان RNA مستقیماً داخل کرایوپریال قرار داده شد و تا زمان شروع آزمایش در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. جهت سنجش اسمولاریته‌ی پلاسما نیز از بچه ماهیان کامل پس از بیهوشی استفاده و در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. مرگ و میر ماهیان نیز در این مدت ثبت شد. سپس نمونه ها با دی اکسید کربن منجمد (Dry Ice) به آزمایشگاه زیست شناسی و مولکولی گروه بیولوژی دانشگاه SDU (Southern Denmark University) در دانمارک جهت سنجش فاکتورهای مورد نظر منتقل شدند.

۱.۲. آزمایش سنجش آنزیم Na^+/K^+ ATPase



شکل ۱ - میزان آنزیم Na^+/K^+ ATPase در آبشش ماهی سفید دریای خزر تحت تاثیر ۶ ppt (حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$)).

سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت و با استفاده از فرمول: $(\times 100) [\text{وزن ابتدایی} / (\text{وزن نهایی} - \text{وزن ابتدایی})]$ محاسبه شد (Moustakas *et al.*, 2004).

۶.۲. آنالیز آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. نرمال سازی داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و جدول تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS17 انجام شد. سنجش اثرات متقابل از طریق آزمون آنالیز واریانس دوطرفه محاسبه شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و نمودارها نیز با نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ رسم شد.

۳. نتایج

۱.۳. فعالیت آنزیم Na^+/K^+ ATPase

در بافت آبشش، میزان فعالیت آنزیم Na^+/K^+ ATPase در ساعات اولیه پس از افزایش شوری افزوده شد و با گذشت زمان از مقادیر آن کاسته شد به طوری که حداکثر مقدار آنزیم، ۲۴ ساعت پس از تماس با شوری ۶ ppt رخ داد ($\mu\text{mol ADP/mg protein/hour}$ $12/92 \pm 59$) و پس از آن این روند نزول پیدا کرد، اما همچنان در ساعت ۷۲ هیچ گونه تفاوت معنی داری را با ساعت ۲۴ نشان نداد ($P > 0.05$) و در ساعت ۱۶۸ نیز کاهش مقدار آنزیم به اندازه‌ای بود که با گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت

۳۰ ثانیه همگن شدند. سپس با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم و انکوبه کردن در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه، به هرتیوب ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول الکل سرد اضافه گردید تا RNA رسوب نماید. پس از سانتریفیوژ مجدد سوپرناتانت جدا و دور ریخته شد. پلت‌های باقی مانده با الکل اتانول شستشو داده شد و با استفاده از خشک کن تحت خلاء Maxi dry پلت‌های به‌جا مانده با ۳۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. در این مرحله غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ND_1000 تعیین شد (Chomczynski and Sacchi, 1987).

۴.۲. سنجش اسمولاریته

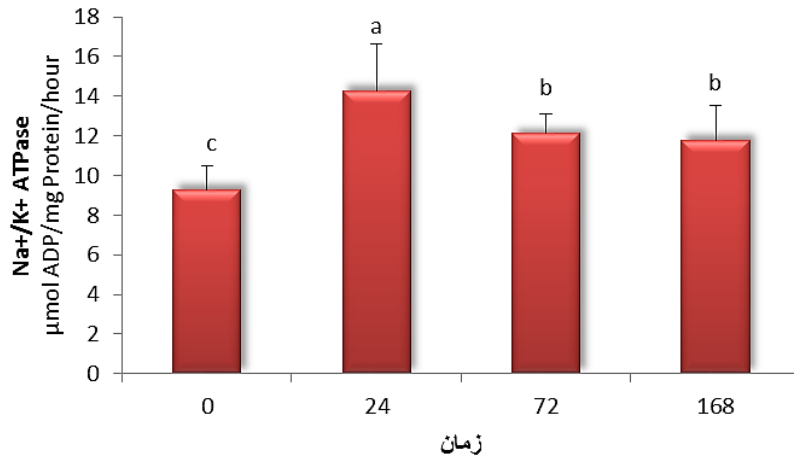
ضمن هموموژنایزر کردن کل بدن ماهی در آب مقطر (Ramsay *et al.*, 2006) و سانتریفیوژ در دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه، از سوپرناتانت حاصله اسمولاریته با استفاده از دستگاه Cryoscopic osmometer مورد سنجش قرار گرفت (Handy and Depledge, 1999).

۵.۲. سنجش درصد تلفات و درصد آب بدن

تعداد تلفات بچه ماهیان پس از گذشت ۱۶۸ ساعت ثبت شد و برای سنجش درصد آب بدن نیز به طور تصافی از هر تکرار ۲ ماهی ($n=6$) نمونه‌برداری شد و این شاخص از طریق اختلاف وزن ایجاد شده قبل و بعد از خشک کردن ماهیان در دمای ۷۰ درجه

جدول ۱ - سطوح معنی داری و اثرات متقابل (زمان * شوری) در تیمارهای مختلف.

| RNA P value | آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ P value | پروتئین P value | اسمولاریته P value | |
|----------------|--------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------|
| ۰/۰۷۴ | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۴۵ | ۰/۰۰۰ | زمان |
| ۰/۰۵۸ | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۰۹ | ۰/۰۰۰ | شوری |
| ۰/۵۹۳ | ۰/۰۱۹ | ۰/۱۸۵ | ۰/۰۰۰ | زمان*شوری |



شکل ۲- میزان آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ در آبشش ماهی سفید دریای خزر تحت تاثیر ۱۱ ppt (حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$)).

اما اثرات متقابل شوری * زمان معنی دار ($P < 0.05$) نگردید ($P > 0.05$) (جدول ۱).

۳.۳. اندازه گیری غلظت RNA

غلظت RNA تحت تماس با شوری ۶ ppt، با این که روند نزولی نسبت به گروه کنترل داشت (شکل ۳)، اما هیچ تفاوت معنی داری در هیچ یک از ساعات با گروه کنترل مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۵). در گروه تحت تماس با شوری ۱۱ ppt نیز در ساعات ۲۴ و ۷۲، هیچ تفاوت معنی داری با گروه کنترل مشاهده نشد ($P > 0.05$) و تنها در ساعت ۱۶۸ میزان RNA با تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.05$) (شکل ۶). نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه در جدول ۱ ذکر شده است.

۴.۳. میزان اسمولاریته

میزان اسمولاریته نیز با گذشت زمان افزایش یافته و در همه ی ساعات پس از تماس با شوری تفاوت کاملا معنی داری با گروه کنترل داشتند. روند نزولی کاهش تا ساعاتی پس از ساعت ۲۴ آغاز شده و تا انتهای زمان آزمایش ادامه داشت، اما این مقدار

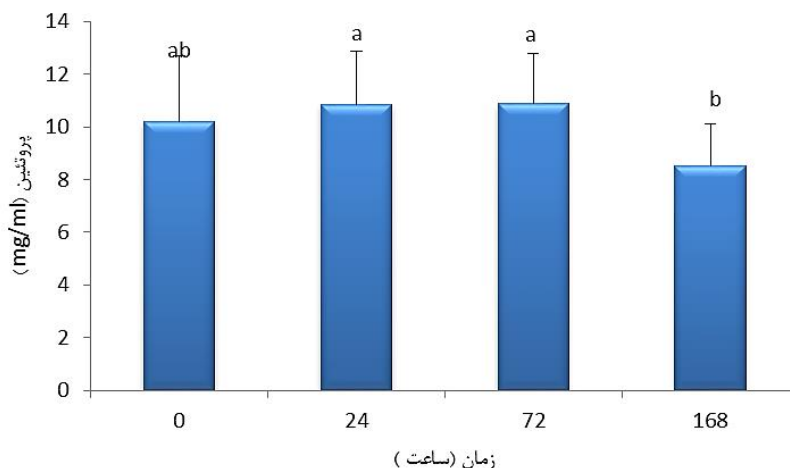
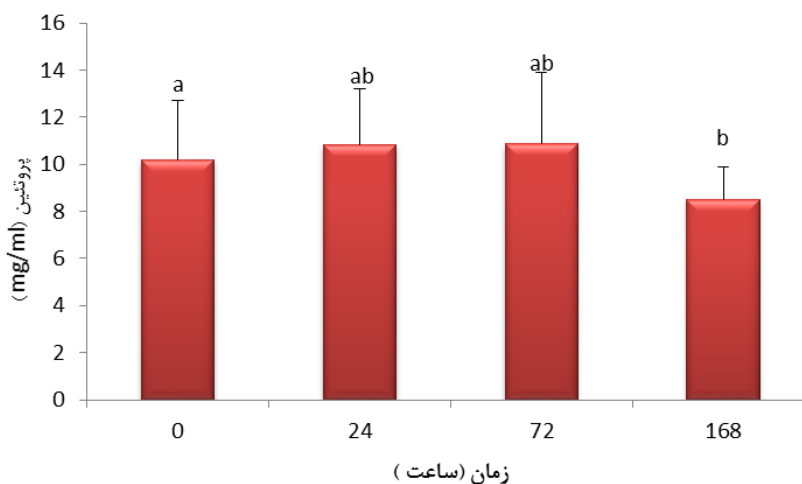
($9.16 \pm 0.70 \mu\text{mol ADP/mg protein/hour}$) (شکل ۱). در شوری ۱۱ ppt حداکثر میزان آنزیم در ساعت ۲۴ مشاهده شد که داری تفاوت معنی داری با گروه کنترل بود ($14.5 \pm 2.39 \mu\text{mol ADP/mg protein/hour}$). از این پس از میزان آنزیم کاسته شد اما همچنان تا ساعت ۱۶۸ میزان فعالیت آنزیم با تفاوت معنی داری نسبت گروه کنترل افزایش داشت ($P < 0.05$) (شکل ۲). در آنالیز واریانس دوطرفه، وجود تفاوت معنی دار فاکتورهای شوری و زمان به تنهایی با میزان آنزیم نشان داده شد ($P < 0.05$) و اثرات متقابل شوری * زمان نیز معنی دار گردید ($P < 0.05$) (جدول ۱).

۲.۳. میزان پروتئین بافت آبشش

میزان پروتئین کل در بافت آبشش پس از تماس با شوری ۶ ppt در زمان های مختلف دارای تفاوت معنی دار نبود ($P > 0.05$) (شکل ۳). تنها در ساعت ۱۶۸ پس از تماس با شوری ۱۱ ppt میزان پروتئین در بافت آبشش با تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.05$) (شکل ۳). در آنالیز واریانس دوطرفه، وجود تفاوت معنی دار فاکتورهای شوری و زمان به تنهایی با میزان پروتئین نشان داده شد

جدول ۲ - درصد آب بدن و میزان تلفات پس از تماس با شوری ۶ و ۱۱ در روز هفتم.

| درصد آب بدن | درصد تلفات | شوری آب |
|-----------------------|-----------------|---------|
| 80.02 ± 1.68^a | صفر | صفر |
| 77.21 ± 0.68^{ab} | صفر | ۶ |
| 74.76 ± 2.06^B | $7/33 \pm 1/52$ | ۱۱ |

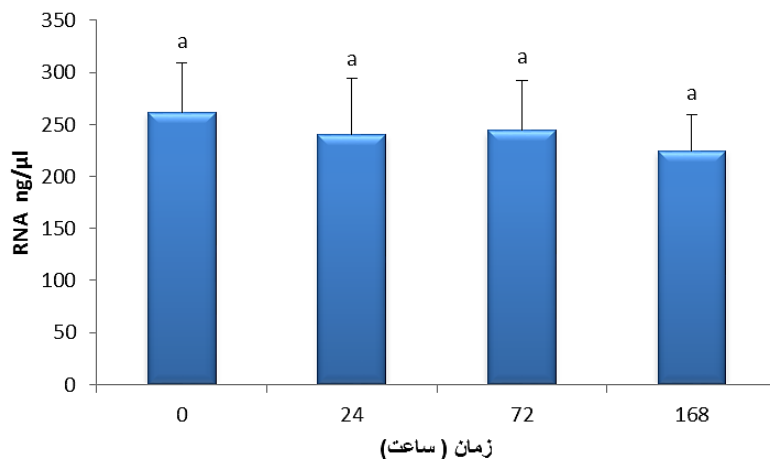
شکل ۳- میزان پروتئین بافت آبشش ماهی سفید دریای خزر تحت تاثیر ۶ ppt (حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد) ($P < 0.05$).شکل ۴- میزان پروتئین بافت آبشش ماهی سفید دریای خزر تحت تاثیر ۱۱ ppt (حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد) ($P < 0.05$).

هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد اما در گروه تحت مواجهه با شوری ۱۱ ppt میزان تلفات $7/33 \pm 1/52$ nvnw محاسبه گردید. درصد آب بدن حاکی از کاهش معنی دار میزان آب بافت بدن در شوری ۱۱ ppt بود ($P < 0.05$) اما در شوری ۶ ppt هیچ گونه تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل و همچنین در مقایسه با ماهیان تحت تماس با شوری ۱۱ ppt مشاهده نشد ($P > 0.05$) (جدول ۲).

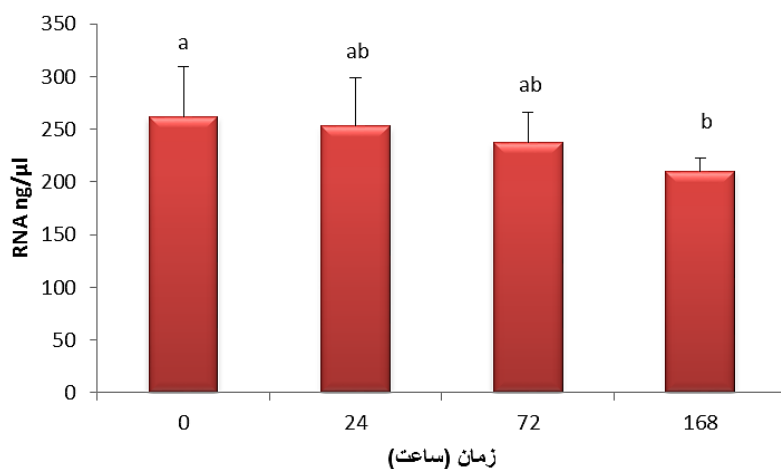
همچنان تفاوت معنی دار خود را با گروه کنترل و حداکثر میزان اسمولاریته حفظ نموده است ($P < 0.05$) (شکل ۷). نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه در جدول ۱ ذکر شده است.

۵.۳. میزان اسمولاریته

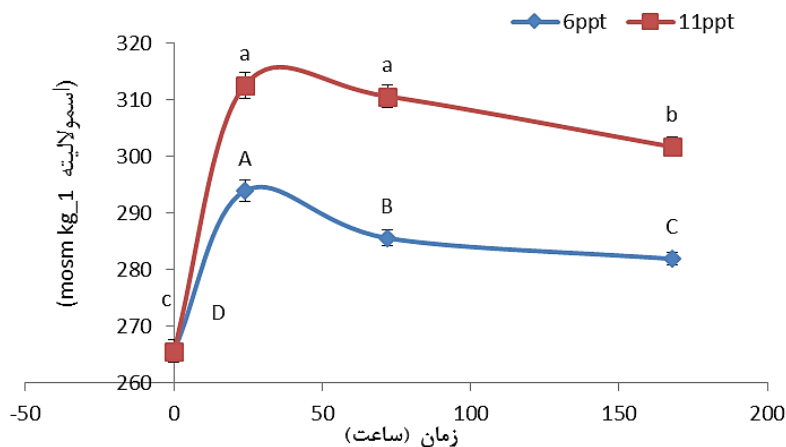
میزان کل تلفات بچه ماهیان نیز در انتهای روز هفتم ثبت شد. در ماهیان تحت تماس با شوری ۶ ppt



شکل ۵- غلظت RNA بافت آبشش تحت تاثیر ۶ ppt (حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$)).



شکل ۶- غلظت RNA بافت آبشش تحت تاثیر ۱۱ ppt (حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$)).



شکل ۷- درصد اسمولاریته بدن تحت شوری ۶ و ۱۱ ppt (حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$)).

۲۰۰۲). آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ به عنوان آنزیم بسیار مهم در تنظیم آب و یون در ماهیان آب شیرین و شور مطرح بوده به طوری که در آب شور وظیفه ترشح نمک و در آب شیرین جذب یون ها را بر عهده دارد (Uchida and Kaneko, 1996). با ورود ماهی از

۴. بحث و نتیجه گیری

هر گونه تغییر در میزان شوری محیط منجر به استرس اسمزی در جانوران آبی شده و بر مکانیسمهای تنظیم یونی سلول اثر گذار خواهد بود (Deane et

این آنزیم پس از گذشت ۶ روز در آب لب شور با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (Khodabandeh *et al.*, 2008). به‌طور کلی افزایش فعالیت آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ در محیط شور نشان از ترشح کارآمد نمک اضافه از بدن به محیط و سازگاری تدریجی ماهی با شرایط جدید است (Li *et al.*, 2014). استرس حاصل از شوری ۱۱ ppt در بچه ماهیان سفید نیز به اندازه‌ای بود که حتی پس از گذشت ۱۶۸ ساعت میزان فعالیت این آنزیم همچنان تفاوت معنی‌دار خود را با گروه کنترل حفظ نمود که نشان از تلاش بچه ماهیان جهت سازگاری با شرایط اسمزی جدید می‌باشد.

تغییر در نرخ سنتز و متابولیسم پروتئین‌ها در بافت‌های مختلف به‌عنوان یکی از اثرات غیر مستقیم شوری مطرح است (Truchot, 1987). این تغییرات را می‌توان به سوق دادن مصرف انرژی در مسیر تنظیم اسمزی نسبت داد (Péqueux, 1995). البته این نکته حائز اهمیت است که پاسخ گونه‌های مختلف ماهی در سنتز پروتئین‌ها متفاوت و با قابلیت آن‌ها در تحمل گستره‌های مختلف شوری مرتبط است. به‌طوری‌که محتوای پروتئین بافت ماهیچه در ماهی قزل‌آلا در آب شور کمتر از آب شیرین بود، اما در ماهی آزاد (*Onchorhynchus kisuth*) پروتئین بیشتری در بافت ماهیچه نسبت به آب شیرین ذخیره شد. در گونه‌هایی همچون مارماهی و تیلاپیا نیز، استرس حاصل از آب شور دریا موجب افزایش در میزان پروتئین آبشش شده است. از طرفی کل پروتئین موجود در پلاسما خون کپور علفخوار در شوری‌های زیر ۱۲ ppt هیچ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (Peyghan *et al.*, 2014) و در ماهی طلایی نیز کل پروتئین پلاسما در شوری ۱۲ ppt میزان کمتری نسبت به شوری ۶ ppt و صفر داشت (Imanpoor *et al.*, 2012). در این مطالعه نیز شوری ۶ ppt هیچ‌گونه تاثیری بر تغییر میزان پروتئین بافت آبشش نداشت و تنها در شوری ۱۱ ppt و در زمان ۱۶۸ ساعت پس از آغاز تماس میزان پروتئین کاهش یافت که البته این میزان با ساعات ۲۴ و ۷۲ تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین شوری ۶ ppt توانایی ایجاد استرس و تاثیر بر سنتز پروتئین در بافت آبشش را نداشته و تنها شوری ۱۱ ppt به میزان محدودی این قابلیت را در اواخر دوره تماس داشته

محیط هیپواسموتیک به هایپراسموتیک بر میزان فعالیت این آنزیم افزوده می‌شود و آغاز افزایش میزان فعالیت این آنزیم از حدود ۳۰ دقیقه تا ۷ روز پس از انتقال در گونه‌های مختلف ماهی متغیر است (Mancera and McCormick, 2000). تغییرات وابسته به شوری و الگوی افزایش فعالیت این آنزیم با افزایش میزان شوری در آبشش ماهیان در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است (Epstein, 1976; Jensen *et al.*, 1998; Sakamoto *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004). اگرچه گاهی میزان سطوح بالای فعالیت این آنزیم در ماهیان دریایی پس از ورود به آب شیرین و محیط‌های با شوری پایین‌تر نیز گزارش شده است (Katoh *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003). در بادکنک ماهی *Spheroids annulatus* پس از گذشت ۲۱ روز کمترین میزان فعالیت این آنزیم در شوری پایین‌تر مشاهده شده است (Pérez-Robles *et al.*, 2011). در این مطالعه، فعالیت آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ با افزایش شوری افزوده شد و با گذشت زمان از میزان آن کاسته گردید. این کاهش در تیمار با شوری ۶ ppt به‌حدی بود که پس از گذشت ۱۶۸ ساعت میزان آنزیم تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت و این بدین معنی است که بچه ماهیان سفید در این شوری کاملاً با شرایط جدید سازگاری یافته‌اند و استرس اسمزی وارده بر ماهیان بسیار خفیف بوده است. در واقع منحنی‌های ارائه شده برای فعالیت آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ نشان دهنده‌ی چگونگی توان تنظیم اسمزی در سن و اندازه‌ای خاص از آن‌گونه‌ی مشخص می‌باشد. کاهش میزان فعالیت این آنزیم پس از یک دوره افزایش، به دلیل نیمه عمر کمتر این آنزیم در اثر تماس با شرایط استرسی هایپراسموتیک عنوان شده است (Mancera and McCormick, 2000). در ماهیان استخوانی جوان اغلب هزینه انرژی تنظیم اسمزی برای سازگاری با محیط جدید، با کمترین میزان ممکن از فعالیت آنزیم انجام می‌شود تا انرژی لازم برای رشد را داشته باشند (Imslan *et al.*, 2003). بنابراین یکی دیگر از دلایل کاهش فعالیت آنزیم در گروه تحت مواجهه با شوری ۶ ppt پس از ۱۶۸ ساعت را می‌توان به سوق دادن مسیر انرژی به سمت افزایش سرعت رشد نسبت داد. در مطالعه‌ای که روی ماهی کفال خاکستری (*Liza aurata*) انجام شد نیز میزان فعالیت

است. پس به نظر می‌رسد آب لب شور استرس اسمزی چندانی را بر اساس قابلیت تغییر در سنتز پروتئین بافت آبشش در بچه ماهیان سفید القا نکرده است. البته توجه به دو عامل طول مدت زمان آزمایش و مرحله تکاملی (سن) جاندار در مطالعات تنظیم یونی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است.

میزان غلظت RNA استخراجی از بافت به عنوان یکی دیگر از شاخص‌های بیوشیمیایی در مواجهه با انواع استرس مطرح است به طوری که وجود شرایط استرسی موجب تغییرات مخرب در بافت، کاهش میزان DNA، RNA و کاهش سنتز پروتئین‌ها خواهد شد (Gowri *et al.*, 2013). در این مطالعه نیز شوری ۶ ppt هیچ تغییری در میزان غلظت RNA استخراجی از بافت آبشش ایجاد نکرد و تنها در آخرین ساعات مواجهه با شوری ۱۱ ppt غلظت RNA کاسته شد اما باز هم نسبت به ساعات ۲۴ و ۷۲ کاهش معنی‌داری نیافت. این نتایج در تطابق با نتایج حاصله از پروتئین قابلیت محدود شوری ۶ و ۱۱ ppt را در القای استرس به بچه ماهیان سفید را تایید می‌نمایند.

میزان اسمولاریته‌ی پلاسمای بچه ماهیان سفید مطابق با گستره اسمولاریته‌ی گزارش شده در ماهیان استخوانی سازگار شده با آب لب شور می‌باشد. با ورود ماهیان به محیطی با شوری بیشتر، به دلیل تاثیر استرس اسمزی بر ساختار و عملکرد فیزیولوژیک بدن و بالا بودن میزان نفوذپذیری غشاهای زیستی به‌ویژه در آبشش‌ها، ورود یون‌ها به داخل بدن ماهی افزایش یافته و همین امر سبب افزایش اسمولاریته خواهد بود (Altinok *et al.*, 1998). در این آزمایش نیز با افزایش شوری و با گذشت زمان بر میزان اسمولاریته‌ی پلاسمای افزوده شده و در ساعت ۲۴ حداکثر میزان آن در بدن ماهی مشاهده شد، سپس این روند سیر نزولی به خود گرفت، اما همچنان این مقدار در ساعت ۱۶۸ دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بود. این روند در خیلی از مطالعات انجام شده روی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) (Sayyad Bourani *et al.*, 2006)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) (Handeland *et al.*, 2003)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Fontainhas *et al.*, 2003) و ماهی استورژن سفید (*Acipenser transmontanus*) (Mojazi Amiri *et al.*, 2009) نیز گزارش شده است. افزایش اسمولاریته‌ی بدن بچه ماهیان سفید و کاهش تدریجی آن‌ها و رسیدن به اسمولاریته‌ی گروه کنترل با تفاوت نسبتاً کم در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (Ataimehr *et al.*, 2010).

با قرار گرفتن در شرایط هایپراسموتیک، آب موجود در بافت‌های مختلف به دلیل عدم آمادگی فیزیولوژیک اندام‌های دفعی در جلوگیری از خروج مایعات، از بدن ماهی خارج می‌شود (Handeland *et al.*, 1998). این مسئله با داده‌های حاصل از پژوهش حاضر نیز مطابقت داشت، به طوری که آب بافت بدن در ماهیان تحت تماس با شوری ۱۱ ppt دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل بودند ($P < 0.05$) اما در ماهیان تحت تماس با شوری ۶ ppt، میزان آب بافت بدن تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل و همچنین گروه تحت مواجهه با شوری ۱۱ ppt نشان ندادند ($P > 0.05$). رابطه‌ی مستقیم افزایش درصد مرگ و میر بچه ماهیان با افزایش شوری در پژوهش‌های متعدد گزارش شده است (Saoud *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). البته باید توجه داشت که امکان تغییر شاخص‌های حساس بر مبنای پروتئین، تحت تاثیر شوری، وجود دارد اما ممکن است هیچ گونه تاثیری بر رشد و بقای ماهی نداشته باشد (O'Neill *et al.*, 2011). در این مطالعه نیز میزان تلفات بچه ماهیان تنها در شوری ۱۱ ppt مشاهده شد و استرس وارده بر بچه ماهیان ماهیان به اندازه‌ای بوده که قابلیت کامل برای برقراری هوموستاز را نداشتند. در گروه تحت مواجهه با شوری ۶ ppt نیز همانند گروه کنترل هیچ تلفاتی رخ نداد. اما به طور کلی بچه ماهیان سفید در این دوره از زندگی خود، به آن اندازه از رشد فیزیولوژیکی رسیده‌اند که توانایی لازم در برقراری تنظیم اسمزی را در پی ورود ناگهانی به محیط لب شور، خصوصاً شوری ۶ ppt داشته باشند.

با توجه به نتایج، کلیه فاکتورهایی که در این پژوهش به‌عنوان شاخص‌های تنظیم اسمزی مد نظر قرار داده شدند، قابلیت سازگاری بچه ماهیان سفید را در شوری‌های ۶ و ۱۱ ثابت کردند و بقای بچه ماهیان در شوری ۶ ppt بیشتر از شوری ۱۱ ppt مشاهده شد. اما با توجه به وضعیت موجود و بار عظیم آلودگی در مصب‌های رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای خزر، به

است. پس به نظر می‌رسد آب لب شور استرس اسمزی چندانی را بر اساس قابلیت تغییر در سنتز پروتئین بافت آبشش در بچه ماهیان سفید القا نکرده است. البته توجه به دو عامل طول مدت زمان آزمایش و مرحله تکاملی (سن) جاندار در مطالعات تنظیم یونی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است.

میزان غلظت RNA استخراجی از بافت به عنوان یکی دیگر از شاخص‌های بیوشیمیایی در مواجهه با انواع استرس مطرح است به طوری که وجود شرایط استرسی موجب تغییرات مخرب در بافت، کاهش میزان DNA، RNA و کاهش سنتز پروتئین‌ها خواهد شد (Gowri *et al.*, 2013). در این مطالعه نیز شوری ۶ ppt هیچ تغییری در میزان غلظت RNA استخراجی از بافت آبشش ایجاد نکرد و تنها در آخرین ساعات مواجهه با شوری ۱۱ ppt غلظت RNA کاسته شد اما باز هم نسبت به ساعات ۲۴ و ۷۲ کاهش معنی‌داری نیافت. این نتایج در تطابق با نتایج حاصله از پروتئین قابلیت محدود شوری ۶ و ۱۱ ppt را در القای استرس به بچه ماهیان سفید را تایید می‌نمایند.

میزان اسمولاریته‌ی پلاسمای بچه ماهیان سفید مطابق با گستره اسمولاریته‌ی گزارش شده در ماهیان استخوانی سازگار شده با آب لب شور می‌باشد. با ورود ماهیان به محیطی با شوری بیشتر، به دلیل تاثیر استرس اسمزی بر ساختار و عملکرد فیزیولوژیک بدن و بالا بودن میزان نفوذپذیری غشاهای زیستی به‌ویژه در آبشش‌ها، ورود یون‌ها به داخل بدن ماهی افزایش یافته و همین امر سبب افزایش اسمولاریته خواهد بود (Altinok *et al.*, 1998). در این آزمایش نیز با افزایش شوری و با گذشت زمان بر میزان اسمولاریته‌ی پلاسمای افزوده شده و در ساعت ۲۴ حداکثر میزان آن در بدن ماهی مشاهده شد، سپس این روند سیر نزولی به خود گرفت، اما همچنان این مقدار در ساعت ۱۶۸ دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بود. این روند در خیلی از مطالعات انجام شده روی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) (Sayyad Bourani *et al.*, 2006)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) (Handeland *et al.*, 2003)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Fontainhas *et al.*, 2003) و ماهی استورژن سفید (*Acipenser transmontanus*) (Mojazi Amiri *et al.*, 2009) نیز گزارش شده است. افزایش اسمولاریته‌ی بدن بچه ماهیان سفید و کاهش تدریجی آن‌ها و رسیدن به اسمولاریته‌ی گروه کنترل با تفاوت نسبتاً کم در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (Ataimehr *et al.*, 2010).

با قرار گرفتن در شرایط هایپراسموتیک، آب موجود در بافت‌های مختلف به دلیل عدم آمادگی فیزیولوژیک اندام‌های دفعی در جلوگیری از خروج مایعات، از بدن ماهی خارج می‌شود (Handeland *et al.*, 1998). این مسئله با داده‌های حاصل از پژوهش حاضر نیز مطابقت داشت، به طوری که آب بافت بدن در ماهیان تحت تماس با شوری ۱۱ ppt دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل بودند ($P < 0.05$) اما در ماهیان تحت تماس با شوری ۶ ppt، میزان آب بافت بدن تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل و همچنین گروه تحت مواجهه با شوری ۱۱ ppt نشان ندادند ($P > 0.05$). رابطه‌ی مستقیم افزایش درصد مرگ و میر بچه ماهیان با افزایش شوری در پژوهش‌های متعدد گزارش شده است (Saoud *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). البته باید توجه داشت که امکان تغییر شاخص‌های حساس بر مبنای پروتئین، تحت تاثیر شوری، وجود دارد اما ممکن است هیچ گونه تاثیری بر رشد و بقای ماهی نداشته باشد (O'Neill *et al.*, 2011). در این مطالعه نیز میزان تلفات بچه ماهیان تنها در شوری ۱۱ ppt مشاهده شد و استرس وارده بر بچه ماهیان ماهیان به اندازه‌ای بوده که قابلیت کامل برای برقراری هوموستاز را نداشتند. در گروه تحت مواجهه با شوری ۶ ppt نیز همانند گروه کنترل هیچ تلفاتی رخ نداد. اما به طور کلی بچه ماهیان سفید در این دوره از زندگی خود، به آن اندازه از رشد فیزیولوژیکی رسیده‌اند که توانایی لازم در برقراری تنظیم اسمزی را در پی ورود ناگهانی به محیط لب شور، خصوصاً شوری ۶ ppt داشته باشند.

با توجه به نتایج، کلیه فاکتورهایی که در این پژوهش به‌عنوان شاخص‌های تنظیم اسمزی مد نظر قرار داده شدند، قابلیت سازگاری بچه ماهیان سفید را در شوری‌های ۶ و ۱۱ ثابت کردند و بقای بچه ماهیان در شوری ۶ ppt بیشتر از شوری ۱۱ ppt مشاهده شد. اما با توجه به وضعیت موجود و بار عظیم آلودگی در مصب‌های رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای خزر، به

مقابل شوری های بالاتر کاست و در عوض آن ها را از حجمی آلاینده های گوناگون موجود در مصب مصوب داشت.

تشکر و قدردانی

از پروفسور استغن مدسن جهت در اختیار گذاشتن امکانات لازم جهت انجام آزمایش ها، در گروه بیولوژی دانشگاه SDU دانمارک و جناب آقای مهندس عاشوری کارشناس آزمایشگاه فیزیولوژی گروه شیلات دانشگاه تهران کمال تشکر را داریم.

References

- Falahatkar, B., Tolouei Gilani, M.H., Falahatkar, S., Abbasalizadeh, A., 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Aquaculture*, 321, 273-279.
- Falahatkar, B., Akhavan, S.R., Tolouei Gilani, M.H., Abbasalizadeh, A., 2013. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 14(2), 133-139
- Amiri, I., sayyad Bourani, 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, 23-30.
- Ataimehr, B., Mojazi Amiri, B., Mirvaghefi, A., Nezami, Sh., Riazi, G.H., 2010. Effect of different salinity on ions, osmolarity, water concentrations of body tissue, gill chloride cells and mortality percentage of juveniles of Caspian roach (*Rutilus frisii kutum* Kamensky 1901). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 2, 115-130
- Altinok, I., Galli, S.M., Chapman, F.A., 1998. Ionic and osmotic regulation capabilities of juvenile Gulf of Mexico sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120, 609-616.
- Bergmeyer, H.U., 1974. Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York. 1201 p.
- Blackburn, J., Clarke, W.C., 1987. Revised procedure for the 24 h seawater challenge test to measure seawater adaptability in juvenile salmonids. Canadian Technology Reports on Fisheries and Aquatic Science 15, 1-35.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Deane, E.E., Kelly, S.P., Luk J.C., Woo. N.Y., 2002. Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream. *Marine Biotechnology*, 4, 193-205.
- Epstein, E. 1976. Kinetics of ion transport and the carrier concept. In: U. Luttge, M.G. Pitman (eds). *Transport in Plants*, Vol. 2, (Heidelberg, Germany, Springer. 97 p.
- Evans, D.H., 1993. Osmotic and Ionic Regulation. In *The Physiology of Fishes*, CRC Press. 315 p.
- Fontainhas-Fernandes, A., Gomes, E.F., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2003. Effect of cortisol on some osmoregulatory parameters of the teleost (*Oreochromis niloticus*) after transference from freshwater to seawater. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 55,307-316.
- Gowri, B., Palaniandy Govindassamy, P., Ramalingam V., 2013. Influence of Cypermethrin on DNA and RNA content in different organs of fresh water fish *Cyprinus carpio*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, 1-10.
- Handeland, S.O., Berge, A., Bjornsson, B.T., Stefansson, S.O., 1998. Effects of temperature salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in seawater. *Aquaculture*, 168, 289-302.
- Handeland S.O., Bjornsson B.T., Arnesen A.M., Stefansson S.O., 2003. Seawater adaptation and growth of parr-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild & farmed strains. *Aquaculture*, 220, 367-384.
- Handy, R. D., Depledge, M. H., 1999. Physiological responses: Their measurement & use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, 8, 329-349.
- Imanpoor, M.R., Najafi, E., Kabir, M., 2012. Effects of different salinity and temperatures on the growth, survival, haematocrit and blood biochemistry of Goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture Research*, 43, 332-338.
- Imsland, A.K., Gunnarsson, S., Foss, A., Stefansson, S.O., 2003. Gill Na^{+} , K^{+} -ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile

- Turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture*, 218, 671-683.
- Jagoe, C.H., Faivre, A., Newman, M.C., 1996. Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II). *Aquatic Toxicology*, 34, 163-183.
- Jensen, M.K., Madsen, S.S., Kristiansen, K. 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Experimental Zoology*, 282, 290-300.
- Khodabandeh, S., Shahriari Moghaddam, M., Abtahi, B., 2009. Changes in Chloride Cell Abundance, Na⁺, K⁺-ATPase Immunolocalization and Activity in the Gills of Golden Grey Mullet, *Liza aurata*, Fry during adaptation to different salinities, *Yakhteh Medical Journal*, 1, 49-54.
- Klesius, P., 2003. Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from Tadpole Madtom in a Southwestern New Jersey River. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15, 295-301.
- Li, J., Wang, J., Yang, L., Y Chen, Y., Yang, Z. 2014. Na⁺/K⁺-ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 375, 41-50.
- Lin, C.H., Tsai, R.S., Lee, T.H. 2004. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green puffer fish, *Tetraodon nigroviridis*, in response. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 138, 287-295.
- Lin, Y.M., Chen, C.N., Lee T.H., 2003. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 135, 489-497.
- Lowry, O.H., Rosemugh, N.J., Farr, A.L., Randall, K.J., 1951. Protein medsurelmentwlth the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Madsen, S.S., Naamansen, T., 1989. Plasma ionic regulation and gill Na⁺/K⁺-ATPase changes during rapid transfer to sea water of yearling rainbow trout, *Salmo gairdneri*: time course and seasonal variation. *Journal of fish Biology*, 34, 829-840.
- Mancera, J.M., McCormick, S.D., 2000. Rapid Activation of Gill Na⁺, K⁺-ATPase in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Zoology*, 287, 263-274.
- McCormick, S.D., Saunders, R.L. 1987. Preparatory physiological adaptations for marine life in salmonids: osmoregulation, growth and metabolism. *American Fisheries Society Symposium*, 1, 211-229.
- McCormick, S.D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*, 41, 781-794.
- Mohiseni, M., 2013. Study on the effect of some heavy metals (lead, nickel and cadmium) and pulp and paper mill kraft effluent on the osmoregulatory capability of juvenile Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*). PhD thesis. Fisheries department, University of Tehran, Iran. 168 p.
- Mojazi Amiri, B., Baker, D.W., Morgan, J.D., Brauner, C.J., 2009. Size dependent early salinity tolerance in two sizes of juvenile white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 286, 121-126
- Moustakas, C.T., Watanabe, W.O., Copeland, K.A., 2004. Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival and osmoregulatory ability of larval Southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*, 229, 159-179.
- Noble, B.S., 1990. Protein turnover in fish tissues: Effects of nutrition, exercise and salinity. PhD thesis, U.K.: University of Aberdeen;
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15, 1-60.
- Perez-Robles, J., Denisse, A., Giffard-Mena, I., Diaz, F., 2011. Interactive effects of salinity on oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and Na⁺/K⁺-ATPase expression in the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). *Aquaculture Research*, 3, 1-12.
- Peyghan, R., Khadjeh, G.H., Enayati, A., 2014. Effect of water salinity on total protein and electrophoretic pattern of serum proteins of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Veterinary Research Forum*, 5, 225-9.
- Prunet, P., Cairns, M.T., Winberg, S., Pottinger, T. G., 2008. Functional genomics of stress responses in fish. *Reviews in Fisheries Science*, 16, 157-166.
- Ramsay, J.M., Feist, G.W., Varga, Z.M., Westerfield, M., Kent, M. L., Schreck, C.B., 2006. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*, 258, 565-574.
- Rudneva, I., 2014. Biomarkers for Stress in Fish Embryos and Larvae, CRC Press. 220 p.
- Sakamoto, T., Uchida K., Yokota. S., 2001. Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. *Zoological Science*, 18, 1163-1174.
- Saoud, P., Kreydiyyeh, S., Chalfoun, A., Fakh, M., 2007. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na⁺-K⁺-ATPase activity in the rabbit fish *Siganus rivulatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 348, 183-190.
- Sayyad Bourani, M., Abtahi, B., Bahmani, M., Kazemi, R., Dazhandian, S., Daghigh Rouhi, J., Amiri, A., 2006. Effect of weghit on osmoregulatory ability of *salmo trutta caspius* juveniles. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 14, 81-96.
- Truchot, J.P., 1987. Adaptations to extreme salinities. In: P. Dejours (Ed.), *Comparative Physiology of Environmental Adaptations. Adaptations to Extreme Environments*. 8th

- Conference of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry, Strasbourg. pp. 196-207.
- Wilson, J.M., Laurent, P. 2002. Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology*, 293, 192-213.
- Yang, W.K., Hseu, J.R., Tang., C.H., Chung, M.J., Wu, S.M., Lee, T.H., 2009. Na^+/K^+ -ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 375, 41-50.
- Zaugg, W.S., 1982. Simplified preparation for adenosine triphosphatase determination in gill tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 215-217.
- Zydlowski, J., McCormick, S.D., 1997. The ontogeny of salinity tolerance in the American shad (*Alosa sapidissima*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 182-189.