



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره هفتم، شماره اول، بهار ۹۸

<http://jair.gonbad.ac.ir>

بررسی متابولیت‌های آبشش تاسماهی ایرانی انگشت‌قد *Acipenser persicus*

Borodin, 1897 در سطوح مختلف شوری آب با استفاده از روش HNMR

خسرو رحیمی^۱، ایمان سوری‌نژاد^{۲*}

^۱دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

^۲دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ ارسال: ۹۷/۱۱/۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۸

چکیده

در تحقیق حاضر ۱۸۰ قطعه تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) در وزن رهاسازی با میانگین وزن کل $1/8 \pm 0/06$ گرم در دو دوره ۹۶ ساعته و ۱۰ روزه در معرض سه شوری متفاوت صفر (آب شیرین)، ۶ و ۱۲ قسمت در هزار قرار گرفتند تا متابولیت‌های آبشش این ماهیان با روش متابولومیکس بر پایه H-NMR سنجیده شود. نتایج نشان داد که تغییرات شوری سبب تغییر در متابولیت‌های دخیل در تنظیم اسمزی مثل بتائین، متیونین و ترئونین شده است. تغییرات شوری همچنین سبب ایجاد تغییرات در متابولیت‌های مهم در متابولیسم انرژی مانند آلانین، DMA و گلوتامین گردید. پس از بررسی متابولیت‌ها مشخص شد که آلانین، بتائین، سرین، گلوتامین، ترئونین، دی‌متیل آمین، اسید فوماریک، متیونین، تیروزین، لوسین، استون، ایزولوسین، سرین و اسید فرمیک بین تیمارهای آب شیرین و آب ۱۲ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار داشت. متابولیت‌های آلانین، بتائین، گلوتامین، ترئونین، دی‌متیل آمین، اسید فوماریک، متیونین، اسید استیک و کولین بین تیمارهای آب شیرین و ۶ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار داشت و متابولیت‌های اسید لاکتیک، اسید فرمیک و سرین بین تیمارهای ۶ و ۱۲ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار نشان داد. نیاز به تهیه انرژی و ایمنی بدن در شرایط افزایش شوری، سبب شد که اسیدهای آمینه شاخه‌دار، لاکتات و آلانین در آب با شوری ۱۲ قسمت در هزار نسبت به آب شیرین افزایش معنی‌دار داشتند. متیونین و تائورین که عامل مقابله با استرس شوری هستند و همچنین متابولیت گلوتامین و اسید فوماریک که عامل مقابله با استرس اکسیژنی هستند نیز افزایش معنی‌دار

*نویسنده مسئول: i_sourinezhad@yahoo.com

بین آب شیرین و شور ۱۲ قسمت در هزار داشتند. متابولیت بتائین که عامل تنظیم اسمزی در شرایط شوری و جلوگیری از کاهش آب درون سلولی است کاهش معنی‌دار بین تیمار آب شیرین و آب با شوری ۱۲ قسمت در هزار داشت. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که متابولیت‌های اسید فوماریک، متیونین و اسیدهای آمینه شاخه‌دار از مهم‌ترین بیومارکرهای مقاومت به شوری در بچه تاسماهی ایرانی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: *A. persicus*، تنظیم اسمزی، استرس، متابولومیکس

مقدمه

تقریباً تمام گونه‌های ماهیان خاویاری (تاسماهیان) یا در حال انقراض اند و یا در معرض خطر انقراض قرار دارند (Boothroyd et al., 2017; Hendry et al., 2015) و دلایل متعددی همچون صید بیش از حد، از بین رفتن زیستگاه‌ها و کیفیت نامطلوب آب محل زندگی از جمله شرایط نامطلوب بیان شده است (Finney et al., 2006). به‌طور کلی تاسماهیان بالغ در زمان جفتگیری به مصب رودخانه‌های بزرگ مادری خود وارد شده و تولید مثل می‌کنند. در نتیجه، تاسماهی‌ها به‌طور مرتب تغییرات شوری را در زمان تولید مثل تجربه می‌کنند. توانایی مقاومت در برابر نوسانات شوری به ظرفیت اسمزی و تنظیم مجدد متابولیت‌ها بستگی دارد. اکثر ماهیان برای مهاجرت بین محیط‌های با شوری‌های مختلف نیاز به مکانیزم فعال سیستم تنظیم اسمزی دارند. در ماهیان استخوانی، سطوح یون‌های خارج سلولی و تنظیم اسمزی عمدتاً توسط آبشش، روده و کلیه‌ها کنترل می‌شود (Bone and Marshall, 1982). ماهیان خاویاری نیز جهت سازگاری با نوسانات شوری دارای سیستم مشابه تنظیم‌کننده اسمزی هستند (Gershanovich et al., 1991).

تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) از گونه‌های موجود در دریای خزر بوده و عمدتاً در سواحل جنوبی دریای خزر یافت می‌شوند. این ماهیان همانند سایر ماهیان خاویاری تغییرات شوری را طی دوره مهاجرت تولید مثلی خود تجربه می‌کنند و به دلیل اینکه گونه بومی سواحل جنوبی دریای خزر است، گونه بسیار مناسبی برای بررسی شرایط تغییرات شوری می‌باشد. ویژگی‌هایی همچون تنظیم اسمزی و میزان آنزیم‌های اکسیداتیو تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) و دیگر گونه‌های ماهیان خاویاری در مطالعات قبلی مورد بررسی قرار گرفته است (Soltan Karimi and Kalbassi, 2018; Hajirezaee et al., 2018). نتایج مطالعات نشان داده است که تغییرات شوری در تاسماهی ایرانی باعث تغییر متابولیت‌هایی در پلاسما خون این ماهی شده، به‌طوری‌که با افزایش شوری، میزان گلوکز افزایش یافته است. همچنین کاهش متابولیت‌های تنظیم اسمزی مانند تائورین و کولین و اسیدهای آمینه مانند آسپاراتات، گلوتامات، گلوتامین و لوسین نیز با افزایش شوری رخ داد (Hajirezaee et al., 2018). در مطالعه

دیگری با استفاده از روش $^1\text{H-NMR}$ و بررسی تأثیر نانو ذرات نقره نشان داده شد که متابولیت لاکتات در تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) در روز دوم نمونه‌برداری کاهش یافته ولی متعاقب آن در روز چهارم نمونه‌برداری افزایش معنی‌دار از خود نشان داد که این تغییرات متعاقب دنا توره شدن آنزیم لاکتات دهیدروژناز بود که حاصل کاهش متابولیت لاکتات می‌باشد (Soltan Karimi and Kalbassi, 2018). نتایج تحقیق دیگری روی ماهی دوتنفسی *Anabas testudineus* براساس کیت‌های سنجش پروتئینی و سنجش متابولیتی نشان داد که هورمون T3 خارج سلولی باعث کاهش معنی‌دار گلوکز و اوره در آبهای لب شور نسبت به آبهای شور می‌شود (Subhash Peter et al., 2011). مطالعاتی نیز روی رشد و وضعیت اسمزی ماهی خاویاری اقیانوس اطلس (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell, 1815) در شرایط شوری‌های مختلف آب انجام شده است (Allen et al., 2014). همچنین مطالعه‌ای با استفاده از NMR روی ماهی سی‌باس *Dicentrarchus labrax* انجام گرفت تا مسیر تأمین انرژی در این ماهی از طریق بررسی مسیر بیوشیمایی گلیکولیز و گلوکونئوزنیز مشخص شود. در این مطالعه گلیسرول وارد مسیر بیوشیمایی گلیکولیز و گلوکونئوزنیز شده و تبدیل به گلوکز و گلیکوژن گردید که عامل‌های تأمین انرژی هستند و از این طریق نیاز این ماهی به انرژی تأمین شد (Rito et al., 2019). تغییرات متابولیتی تاسماهیان ایرانی نیز توسط روش NMR در مطالعات مختلفی مورد بررسی گرفته است (Hajirezaee et al., 2018; Soltan Karimi and Kalbassi, 2018).

آبشش ماهیان اندام چند منظوره‌ای است که نقش اساسی در تنظیم یونی، تنظیم اسید و باز و دفع زائدات نیتروژنی را دارد و اولین و مهمترین اندام درگیر با تغییرات شوری در نظر گرفته می‌شود (Wenwen et al., 2019). از این رو بسیاری از تحقیقات یونی و تنظیم اسمزی ماهیان بر آبشش آنها متمرکز دارد (Marshall, 2002; Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Wenwen et al., 2019).

متابولومیکس یکی از زمینه‌های علمی با استفاده از فن‌آوری‌های با سطح عملکرد بالا است که بر شناسایی و کمی‌سازی مولکول‌های کوچک متابولیت‌ها در متابولوم متمرکز شده است (German et al., 2005). متابولومیک، متابولیت‌های مولکولی با وزن کم (> ۵۰۰ دالتون) را در سلول، بافت یا مایع زیستی یک ارگانیسم شناسایی می‌کند (Bundy et al., 2009; Lankadurai et al., 2013). این متابولیت‌ها سوبسترای هستند که بوسیله واکنش‌های آنزیمی تولید شده و دارای اثرات مستقیم بر روی فنوتیپ سلول‌ها می‌باشند. هدف متابولومیکس بررسی تمام محصولات متابولیکی در یک موجود بدون هیچگونه پیش‌داوری و انتخاب (بر پایه یک یا چند ماده متابولیکی مورد نظر) است و این روند را اصطلاحاً

پیش‌بینی نشده و غیرهدفدار^۱ می‌گویند و در واقع شناسایی متابولیت‌هایی است که از قبل آنها را نمی‌شناختند.

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) بر پایه پروتون، یک روش بسیار انعطاف‌پذیر و متنوع بوده که نقش قابل توجهی در شناسایی ترکیبات متابولیتی در مطالعات متابولومیکس ایفا می‌کند. شناسایی متابولیت‌ها در تحقیق حاضر براساس پروتون اتم هیدروژن (HNMR) صورت گرفته است که می‌توان با این روش تغییرات متابولیت‌ها را در شرایط مختلف سنجید. این تکنیک در قیاس با تکنیک‌های سنتی، تحلیل جامعی ارائه می‌دهد و با وجود سهولت آماده‌سازی نمونه و استخراج در یک آزمایش واحد، اطلاعات شیمیایی در طیف‌های گسترده‌ای از ترکیبات موجود در نمونه را حاصل می‌نماید (Wenwen et al., 2019). شناخت مراحل و تغییرات متابولیت‌ها حین انتقال به آب شور راهکاری برای شناخت بیومارکرهای متابولیتی مختص آب شور می‌باشد که به شناخت تغییرات فیزیولوژیک ماهی در این انتقال کمک می‌کند.

هدف از این مطالعه مشخص کردن پروفایل متابولیتی بچه تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) است که در معرض شوری‌های مختلف قرار گرفته است. به دلیل اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی این گونه و در حال انقراض بودن آن و همچنین باتوجه به اینکه تاسماهی ایرانی از گونه‌های بومی و منطقه‌ای ایران می‌باشد و به همین دلیل میزان رهاسازی آن به دریا به منظور بازسازی ذخایر بیشتر است، لذا مطالعه سیستم اسمزی جهت رهاسازی و آدپتاسیون به محیط آب دریای خزر دارای اهمیت می‌باشد. بنابراین در مطالعه حاضر تغییرات متابولیتی تاسماهی ایرانی در شرایط تغییر شوری آب بررسی شد تا از این طریق مهم‌ترین بیومارکرهای متابولیتی این ماهی مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

برای انجام تحقیق حاضر، ۱۸۰ قطعه بچه تاسماهی ایرانی با میانگین وزن کل $1/8 \pm 0/06$ گرم در وزن رهاسازی در سه سطح مختلف شوری (آب شیرین رودخانه، ۶ قسمت در هزار و ۱۲ قسمت در هزار) مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌برداری از بچه تاسماهیان ایرانی در تابستان ۱۳۹۶ و در مرکز شهید رجایی ساری انجام گرفت. قبل از شروع آزمایش، ماهی‌ها به مدت یک ماه روزانه سه مرتبه در حد سیری با کرم قرمز منجمد (شرکت ماهیران، تهران) تغذیه شدند و ۴۸ ساعت پیش از شروع آزمایشات غذادهی قطع گردید.

۱. Untargeted metabolomics

ماهی‌ها در شرایط آزمایشگاهی در وان‌های ۴۵ لیتری و به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. آب درون وان‌های آزمایش هوادهی شده و غلظت صفر (آب شیرین)، غلظت ۶ قسمت در هزار با رقیق کردن آب دریا و غلظت ۱۲ قسمت در هزار که همان شوری آب دریای خزر بود مورد استفاده قرار گرفت. ماهیان در سه گروه شوری تقسیم شدند و به مدت دو هفته با شرایط آب آزمایش آداپته شدند. با شروع تحقیق، آب تیمارهای مختلف شوری به صورت روزانه ۵۰٪ تعویض شد. ماهیان به تعداد ۲۰ قطعه در مخازن آزمایشی در هر یک از سه تکرار و در مجموع، ۶۰ قطعه در هر تیمار قرار گرفتند.

در پایان دوره ده روزه تعداد ۱۲ عدد ماهی از هر تکرار و در مجموع ۳۶ ماهی از هر تیمار نمونه‌برداری شد. آبشش‌های چپ و راست به دقت و کامل از ماهی‌ها جدا شده و سریعاً با آب مقطر شستشو داده شدند. آبشش‌های جدا شده در میکروتیوب‌های پلاستیکی نامگذاری شده قرار گرفتند و نمونه‌ها سریعاً درون ازلت مایع تثبیت شدند. نمونه‌ها برای نگهداری طولانی مدت به فریزر -80°C منتقل شدند و سپس جهت سنجش متابولیت‌ها، نمونه‌ها روی یخ خشک قرار گرفته و به دانشکده بیومدیکال دانشگاه کالیاری ایتالیا منتقل شدند و برای سنجش متابولیتی مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت استخراج متابولیت‌ها از آبشش تاسماهی ایرانی، از پروتوکول استخراج (Folch *et al.*, 1975) استفاده شد. ابتدا نمونه‌های فریز شده توزین و به ازای هر گرم نمونه، ۱۲ میلی‌لیتر حلال (کلروفرم/متانول/آب به نسبت ۲:۱:۱) به نمونه‌ها اضافه شد. بعد از اضافه شدن حلال، نمونه روی یخ و با استفاده از هموژنایزر برقی، هموژن شد. نمونه‌های هموژن شده به سانتریفیوژ منتقل و در 2000g ، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ دو فاز تشکیل گردید، فاز اول که حاوی متانول و آب و با وزن مولکولی کمتر بود شامل متابولیت‌های محلول در آب بود و از فاز دوم حاوی کلروفرم به دقت جدا گردید. سپس فاز آب/متانول با استفاده از دستگاه چرخان تبخیرکننده (Eppendorf Concentrator Plus) خشک شد و تا زمان سنجش متابولیت‌ها با دستگاه NMR در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

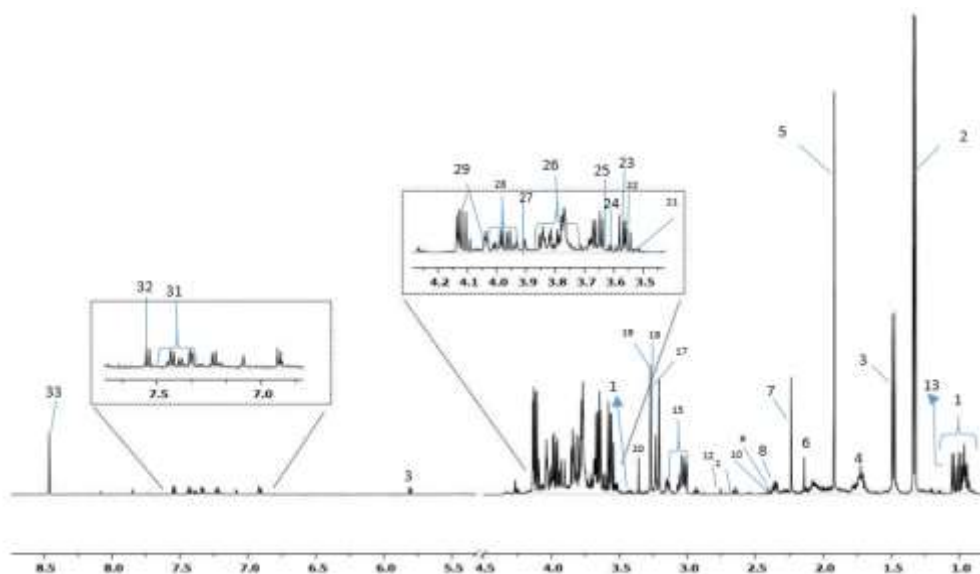
نمونه‌های خشک شده در دستگاه تغلیظ‌کننده در 670°C میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (۱/۰ مولار، $\text{pH}=7/4$) حل و سپس $30\text{ }\mu\text{L}$ TSP (سدیم تری متیل سیلان پروپیونات)، به عنوان استاندارد داخلی به آن اضافه شد. سپس در 13000 g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در انتها $650\text{ }\mu\text{L}$ از محلول به تیوب‌های 5 mm NMR، جهت آنالیز NMR اضافه شد (Aru *et al.*, 2016). طیف‌های HNMR در 300 k با استفاده از اسپکترومتر 500 (Agilent) Varian Unity Inova (Technologies, CA, USA) در فرکانس لارمور $499/839\text{ MHz}$ به دست آمدند.

طیف‌های NMR با استفاده از نرم‌افزار MestRenova (Mestrelab Research SL, Version 8.1, Santiago de Compostela, Spain) مورد پردازش قرار گرفتند. برای شناسایی متابولیت‌ها، از نرم‌افزار Chenomx NMR suite 8.2 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta) استفاده شد. سپس با استفاده از

نرم‌افزار Chenomex processor طیف‌های NMR پردازش شده و پس از قرار دادن پیک TSP، در تغییر شیمیایی صفر ppm و تنظیم pH و غلظت TSP، با پسوند Cnx ذخیره و سپس برای شناسایی متابولیت با نرم‌افزار Chenomex profiler باز شدند. تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های چندمتغیره (PCA) که فضای داده‌های چند بعدی را به مدلی با ابعاد کم تبدیل می‌کند، برای جداسازی گروه‌های نمونه مورد استفاده قرار گرفتند. قبل از تجزیه و تحلیل PCA، مجموعه داده‌های NMR نرمال شده و متعاقب آن با اعمال لگاریتم تغییرات و یکسان‌سازی خودکار داده‌ها آزمون انجام شد. تمام داده‌های نرمال‌سازی و تجزیه و تحلیل PCA با استفاده از MetaboAnalyst، ابزار جامع مبتنی بر وب انجام شد که برای پردازش، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌های متابولیتیک طراحی شده است.

نتایج

طیف‌های H NMR آبشش تاسماهی ایرانی در شکل ۱ نشان داده شده است. متابولیت‌های مشاهده شده شامل اسیدهای آمینه، اسمولیت‌ها و متابولیت‌های پر انرژی بودند.



شکل ۱- نمایش متابولیت‌های طیف H NMR شناسایی شده فاز آبی حاصل آنالیز استخراج از آبشش تاسماهی ایرانی (*A. persicus*): (۱): اسیدهای آمینه شاخه‌دار (ایزولوسین، لوسین و والین) (۲) لاکتات (۳) آلانین (۴) لوسین (۵) استات (۶) متیونین (۷) استون (۸) گلوتامات (۹) پیرووات (۱۰) سوکسینات (۱۱) متیونین (۱۲) دی متیل آمین

۱. Principal Component Analysis

(۱۳) s-۳- هیدروکسی ایزو بوتیرات (۱۴) تاتورین (۱۵) لیزین (۱۷) ا- فسفوکولین (۱۸) کولین (۱۹) بتائین (۲۰) سوکسینات (۲۱) کولین (۲۲) گلیسین (۲۳) گلیسرول (۲۴) ترئونین (۲۵) والین (۲۶) گلوکونات (۲۷) بتائین (۲۸) سرین (۲۹) گلوکونات (۳۰) یوراسیل (۳۱) فنیل آلانین (۳۲) یوراسیل (۳۳) فورمات.

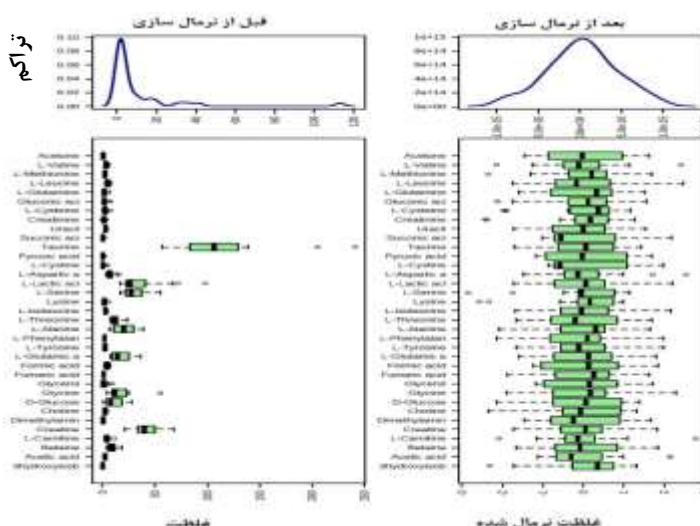
پس از گذشت دوره ده روزه آزمایش و بررسی طیف‌های NMR حاصل از تیمارهای شوری در تاسماهیان ایرانی متابولیت‌هایی همچون اسیدهای آمینه ضروری (فنیل آلانین، والین، ترئونین، متیونین، لوسین، ایزولوسین و لیزین)، اسیدهای آمینه غیر ضروری (آلانین، تیروزین، گلیسین و سرین)، متابولیت‌های دخیل در چرخه تری کربوکسیلیک اسید (سوکسینات، فومارات، لاکتات و استات)، کربوهیدرات‌ها (گلوکز)، کولین، فسفوکولین، گلیسرول، استون، بتائین، دی‌متیل آمین و فرمات شناسایی شدند. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که متابولیت‌های آلانین، بتائین، سرین، گلوتامین، ترئونین، دی‌متیل آمین، اسید فوماریک، متیونین، تیروزین، لوسین، استون، ایزولوسین و اسید فرمیک بین تیمارهای آب شیرین و آب دریای خزر (۱۲ قسمت در هزار) تفاوت معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). متابولیت‌های آلانین، بتائین، گلوتامین، ترئونین، دی‌متیل آمین، اسید فوماریک، متیونین، اسید استیک و کولین بین تیمارهای آب شیرین و آب با شوری ۶ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار از خود نشان دادند ($P < 0.05$). متابولیت‌های اسید لاکتیک، اسید فورمیک و سرین بین تیمارهای ۶ قسمت در هزار و ۱۲ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.05$). جدول (۱) مسیرهای بیوشیمیایی را نمایش می‌دهد که متابولیت‌های تغییر یافته در تیمارهای مختلف شوری باعث ایجاد آنها شده‌اند. داده‌های مربوط به متابولیت‌ها قبل از انجام آزمون‌های مربوط به Metaboanalyste ابتدا نرمال‌سازی روی آنها انجام شد و متابولیت‌ها برای آنالیزهای مربوطه آماده می‌شدند (شکل ۲).

جدول ۱- مقایسه مسیرهای بیوشیمیایی مؤثر در تغییرات شوری در تیمارهای آزمایشی بررسی متابولیت‌های آبشش تاسماهی ایرانی انگشت‌قد (*A. persicus*) در سطوح مختلف شوری آب با استفاده از روش HNMR

مسیرهای بیوشیمیایی متفاوت بین تیمارها	مجموع کل متابولیت‌ها	تعداد متابولیت‌های تغییر یافته	تفاوت معنی داری بر اساس متابولیت‌ها	تفاوت معنی دار مسیرهای بیوشیمیایی بر اساس متابولیت‌های اصلی
متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین	۳۱	۴	۰/۰۰۰۲۶۹	۰/۰۴
بیوسنتز آمینو اسیل tRNA	۶۷	۵	۰/۰۰۰۵۴۹	۰/۰۰
متابولیسم پرولین و آرژنین	۴۳	۳	۰/۰۰۱۰۷	۰/۰۱
متابولیسم اسید سلنو آمینو	۱۷	۲	۰/۰۰۱۴۵	۰/۰۰
سیکل سترات (سیکل TCA)	۲۰	۲	۰/۰۰۱۹۸	۰/۰۵
متابولیسم پیرووات	۲۲	۲	۰/۰۰۲۳۸	۰/۰۵
گلیکولیز یا گلوکونئوزنر	۲۶	۲	۰/۰۰۳۲۶	۰/۰۳

متابولیسم D- گلوتامین و D- گلوتامات	۵	۱	۰/۰۰۵۴۹	۰/۰۰
متابولیسم پیریمیدین	۴۱	۲	۰/۰۰۷۴۷	۰/۰۴
متابولیسم سولفور	۹	۱	۰/۰۰۹۶۷	۰/۰۴
بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین	۱۳	۱	۰/۰۱۳۷	۰/۰۰

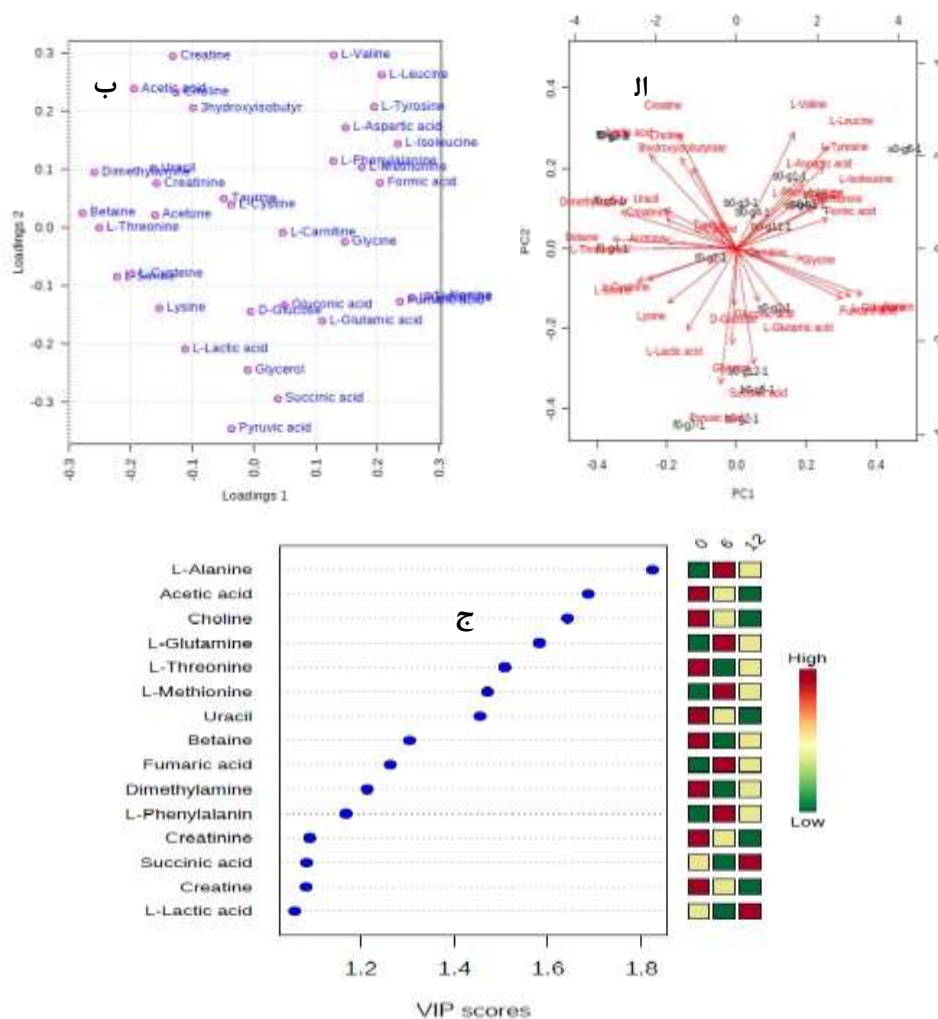
شکل ۲ مسیرهای بیوشیمایی واکنش موجودات را در قبال تغییر شرایط زیستی نشان می‌دهد که موجود مورد نظر چه واکنش‌هایی را جایگزین شرایط معمولی خود می‌کند تا بتواند با استرس‌های محیطی مقابله کند. متابولیت‌ها در انجام این مسیرهای بیوشیمایی مؤثر هستند که شروع یک مسیر بیوشیمایی را تحریک می‌کنند. از آنجایی که تغییرات این متابولیت‌ها هدف انجام این تحقیق بوده که چه تغییراتی در مقابله با شوری در تاسماهیان ایرانی رخ می‌دهد، از این رو متابولیت‌های مهم و تأثیرگذار و همچنین مسیرهای بیوشیمایی که از این تغییرات متابولیت‌ها رخ می‌دهند مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.



شکل ۲- نمودارهای مربعی و نمودارهای تراکم هسته‌ای قبل و بعد از نرمال‌سازی. با توجه به محدودیت فضا، نمودارهای مربعی حداکثر ۵۰ ویژگی را نشان می‌دهند. نمودارهای تراکم برای تمام نمونه‌هاست. روش‌های انتخاب شده: نرمال‌سازی ریاضی؛ نرمال‌سازی احتمالی خارج قسمت توسط یک گروه مرجع؛ تبدیل داده‌ها؛ تبدیل مکعب ریشه؛ اندازه‌گیری داده؛ اندازه‌گیری خودکار.

در شکل ۳ (الف): تغییرات Biplot های PCA ها که نمایانگر مؤلفه های اصلی در نمودارهاست و تغییرات را براساس مهمترین متابولیت ها نمایش می دهد، (ب): PLS-DA (Partial least squares- Discriminant Analysis) های، داده های مرتبط به متابولیت های مشاهده شده در تیمارهای شوری است

که بالاترین اولویت را از مهمترین متابولیت‌ها دارند را نمایش داده می‌دهد. (ج): VIP scores که توسط PLS-DA به دست آمده است نمایانگر غلظت نسبی مهمترین متابولیت‌ها در تفکیک تیمارهای شوری است که تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) را بین تیمارهای شوری نمایش می‌دهد.



شکل ۳: الف) PCA biplot بین PCهای انتخاب شده، با نشان دادن متابولیت‌ها برای جداسازی این گروه‌ها (۰ قسمت در هزار، ۶ قسمت در هزار و ۱۲ قسمت در هزار) استفاده شدند. ب) Loading-plot نشان‌دهنده اهمیت متابولیت‌ها در جدایش بین گروه‌هاست (آب شیرین، ۶ قسمت در هزار و ۱۲ قسمت در هزار). ج)

متابولیت‌های مهم شناسایی شده توسط PLS-DA. جعبه‌های رنگی در سمت راست نشان‌دهنده غلظت نسبی متابولیت مربوطه در هر گروه مورد مطالعه است.

بحث و نتیجه‌گیری

ماهی‌ها در محیط‌هایی با شوری‌های متفاوت زندگی می‌کنند و مکانیسم‌های پیچیده‌ای برای حفظ تعادل اسمزی و یونی دارند که به آنها امکان عملکرد، بقا و انجام فرآیندهای فیزیولوژیکی را می‌دهد (Hwang and Lee, 2007; Evans *et al.*, 2005). به‌طور معمول در زمان تنظیم اسمزی میزان انرژی مورد نیاز سلول افزایش می‌یابد (Evans *et al.*, 2005). ذخایر انرژی یک عامل محدودکننده برای فرآیندهای فیزیولوژیک می‌باشد. بنابراین مطالعه متابولیسم انرژی، موضوع مهمی در مطالعات فیزیولوژیک می‌باشد. اکثر ماهیان برای مهاجرت بین محیط‌های با شوری‌های مختلف نیاز به مکانیزم فعال سیستم تنظیم اسمزی دارند. در ماهیان استخوانی، سطوح یون‌های خارج سلولی و تنظیم اسمزی عمدتاً توسط آبشش، روده و کلیه‌ها کنترل می‌شود (Bone and Marshall, 1982). ماهیان خاویاری نیز جهت سازگاری با نوسانات شوری دارای سیستم مشابه تنظیم‌کننده اسمزی هستند (Gershanovich *et al.*, 1991).

در تحقیق حاضر، مقایسه نمودارهای تاسماهیان ایرانی نگهداری شده در آب شیرین و دریای خزر نشان داد که آلانین و گلوتامین از مهمترین متابولیت‌های تغییر یافته در اثر شوری می‌باشند که تفاوت معنی‌دار داشتند و همچنین آلانین در شوری ۱۲ قسمت در هزار در قیاس با گروه شوری ۶ قسمت در هزار و آب شیرین افزایش معنی‌دار در آبشش تاسماهیان ایرانی از خود نشان داد. در این مطالعه مشخص گردید که مسیر بیوشیمیایی "متابولیسم آلانین، آسپارات و گلوتامات" در تاسماهی ایرانی دریای خزر در شرایط تغییر شوری آب رخ داده است که تأییدی بر تغییرات آلانین و گلوتامین در این مسیر بیوشیمیایی است. آلانین از اسمولیت‌هایی است که با حذف آمین یک تأمین‌کننده انرژی در ماهیان است (Walton and Cowey, 1977). احتمال داده شده است که آلانین به عنوان ناقل ترجیحی گروه ازت اسیدهای آمینه برای حمل و نقل داخل بافت می‌باشد (Mommssen *et al.*, 2011). چندین آمینو اسید می‌توانند به آلانین تبدیل شوند و به جریان خون آزاد شده و به عنوان سوخت سایر بافت‌ها عمل کنند (Kultz and Jurss, 1993). در مطالعه انجام شده در ماهی سوف بالارونده (*Anabas testudineus*) که با دستگاه‌های سنجش آمینو اسیدها انجام شد مشخص گردید که اسیدآمینه آلانین پس از ۶ روز سازگاری با آب دریا افزایش نشان داده است (Chang *et al.*, 2007). همچنین آلانین در

عضلات و آبشش ماهی چار قطبی *Salvelinus alpinu*، پس از گذشت ۹۶ ساعت سازگاری به آب دریا، افزایش نشان داد (Bystriansky et al., 2007).

اسیدهای آمینه شاخه‌دار (BCAAs) (لوسین، ایزولوسین و والین) در این تحقیق بین تیمارهای آب شیرین و آب ۱۲ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار داشتند. این متابولیت‌ها برای افزایش ایمنی کنار تولید انرژی فعالیت دارند (Calder, 2006). BCAAs اسیدهای آمینه‌ای هستند که برای سیستم ایمنی و ذخیره انرژی لازم بوده و علاوه بر این پیش‌ساز مولکول‌های جدید و به‌ویژه لنفوسیت‌ها هستند (Calder, 2006). در این مطالعه مشخص گردید که متابولیت متیونین تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای صفر و ۶ قسمت در هزار و همچنین تیمارهای صفر و ۱۲ قسمت در هزار داشت. در مسیر بیوشیمیایی آمینوآسیل t-RNA، متیونین و آلانین از متابولیت‌های مؤثر هستند. عنوان شده است که در آبشش ماهی *Cynoglossus semilaevis* اسیدهای آمینه آلانین، لوسین، گلیسین و والین اختلاف معنی‌دار در سطوح مختلف شوری آب داشتند (Wenwen et al., 2019) و همچنین متابولیت متیونین در پلاسما ماهی *Cynoglossus semilaevis* قرارگرفته در استرس شوری افزایش یافته است. افزایش اسیدهای آمینه پلاسما می‌تواند حاصل کاهش ساخت پروتئین‌های جدید باشد (Sadok et al., 2004). اسید آمینه متیونین به تائورین تبدیل می‌شود که تائورین در این شرایط برای مقابله با استرس افزایش می‌یابد و اسیدهای آمینه آلانین و اسید گلوتامیک، متابولیسم تائورین را مهار می‌کنند (Schneider et al., 2006). در مطالعه حاضر به دلیل افزایش معنی‌دار آلانین و گلوتامین ساخت تائورین و به تبع آن تبدیل آن از متیونین کاهش یافت. متیونین عامل مقابله با شرایط استرس شوری است. متابولیت‌های گلوتامین و فومارات در شوری‌های بالاتر تفاوت معنی‌دار با آب شیرین داشتند. افزایش گلوتامین حاصل از سنتز گلوتامات است. گلوتامین در گلوکاتیونی که از آنزیم‌های مؤثر در استرس اکسیداتیو است وجود داشته و یکی از متابولیت‌های مؤثر در مسیر بیوشیمیایی "متابولیسم آلانین، آسپاراتات و گلوتامات" است و علاوه بر این از متابولیت‌های مهم مسیر بیوشیمیایی "متابولیسم آرژنین و پرولین" نیز می‌باشد (Yelamanchi et al., 2016).

در این مطالعه استرس شوری که یکی از عوامل ایجاد استرس اکسیرژنی در شرایط افزایش شوری در آبشش است، سبب شد متابولیت اسید فوماریک در شوری‌های ۶ قسمت در هزار و ۱۲ قسمت در هزار نسبت به آب شیرین، افزایش معنی‌دار داشته باشد. اسید فوماریک تغییر شکل‌یافته اکسیداسیون اسید سوکسینیک از طریق دهیدروژنز سوکسینات است. در سلول‌های انسانی اسید فوماریک در اطراف سلول‌های توموری و سرطانی یافت می‌شود و عامل دسترسی سریع به اکسیژن است که نیاز تکثیر

۱۱. Branched chain amino acids

سلول‌های سرطانی و رشد رگ‌های خونی است. همچنین اسید فوماریک در شرایط ایجاد استرس اکسیژنی، عامل فعالیت فاکتور رونویسی ژن HIF (HIF- α) می‌باشد که عامل مقابله با استرس اکسیژنی است (Sreekumar *et al.*, 2009).

در تحقیق حاضر متابولیت دی‌متیل‌آمین بین تیمار آب شیرین و تیمارهای ۶ و ۱۲ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار داشت. عنوان گردیده است که دی‌متیل‌آمین کاهش معنی‌دار با افزایش شوری داشته است (Wu *et al.*, 2017) که مطابق با نتایج تحقیق فعلی می‌باشد. میزان بتائین در آزمایش حاضر با افزایش شوری تا سطح آب لب شور ۱۲ نسبت به آب شیرین کاهش از خود نشان داد. همچنین میزان بتائین در آب شیرین با آب با شوری ۶ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار از خود نشان داد. در آبشش خرچنگ *Ruditapes Philippinarum* میزان بتائین در آب لب‌شور نسبت به آب‌های با شوری بالاتر افزایش داشت (Wu *et al.*, 2013). همچنین در انسان متابولیت بتائین یک اسمولیت است که در شرایط شوری بالا تنظیم اسمزی را انجام می‌دهد و همچنین عامل جلوگیری از کاهش آب درون سلولی در شرایط افزایش شوری محیط است (Sreekumar *et al.*, 2009).

در مسیر بیوشیمیایی گلیکولیز و گلوکونئوزیز متابولیت لاکتات نقش دارد و افزایش آن در مطالعه حاضر نمایانگر این موضوع است که نیاز به انرژی در شرایط افزایش شوری از طریق افزایش این متابولیت رخ می‌دهد (Schreck *et al.*, 2016; Fernández-Alacid *et al.*, 2019). همچنین میزان استون کاهش معنی‌داری در تیمار آب شیرین نسبت به تیمار ۱۲ قسمت در هزار نشان داد. کاهش استون بیانگر این موضوع است که برای تولید انرژی استون مصرف شده چرا که در افرادی که در شرایط استرس و گرسنگی قرار گرفته‌اند استون وارد مسیر بیوشیمیایی گلوکونئوزیز شده و برای تأمین انرژی استفاده می‌شود (Yelamanchi *et al.*, 2016).

در این مطالعه میزان لاکتات بین تیمارهای ۶ قسمت در هزار و ۱۲ قسمت در هزار تفاوت معنی‌دار داشت. عمده ماهیان نسبت به استرس پاسخ‌های مشابهی نشان می‌دهند که آن هم افزایش متابولیت‌های گلوکز، لاکتات و کورتیزول است. همین‌طور این متابولیت‌ها منابع تولید انرژی در شرایط استرس هم هستند. در مطالعات پیشین مشخص شد که کربوهیدرات‌ها از منابع غذایی مورد استفاده آبزیان هستند که متابولیت حاصل از هضم آنها، به عنوان منبع مستقیم انرژی مورد نیاز استفاده می‌شود و بخشی از آنها به صورت گلیکوژن یا پلی‌ساکارید از طریق گلیکوژنز در کبد و یا سایر اندام‌ها ذخیره می‌گردند (Chesley *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2003). تغییرات میزان متابولیت لاکتات در شرایط استرسی مختلف، براساس تحمل موجود زنده متفاوت می‌باشد (Schreck *et al.*, 2016; Fernández-Alacid *et al.*, 2019).

در جمع‌بندی نتایج، در تاسماهی ایرانی در شرایط استرس شوری متابولیت‌های متیونین و تائورین تفاوت معنی‌دار بین تیمار آب شیرین و آب با شوری ۱۲ قسمت در هزار از خود نشان دادند. متابولیت‌های لوسین، ایزولوسین، والین، استون، لاکتات و آلانین از متابولیت‌های تأمین‌کننده انرژی هستند که تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای آب شیرین و آب با شوری ۱۲ قسمت در هزار داشتند. متابولیت گلوتامین و اسید فورمیک که نقش اساسی در استرس اکسیژنی دارند در تحقیق حاضر تفاوت معنی‌دار بین تیمار آب شیرین و آب با شوری ۱۲ قسمت در هزار از خود نشان دادند. همچنین میزان بتائین در شوری‌های بالاتر (آب لب شور) کاهش معنی‌داری از خود نشان داد که برخلاف ماهیان دریایی بود. اسیدهای مهم در چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید همچون سوکسینات و اسیدلاکتیک افزایش معنی‌دار از خود نشان دادند که نمایانگر نیاز به مصرف انرژی بیشتر در شوری‌های بالاتر است. در نتیجه‌گیری نهایی، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد اسیدهای آمینه شاخه‌دار، لاکتات، آلانین، متیونین، تائورین، گلوتامین و اسیدفوماریک از متابولیت‌های مؤثر در تنظیم اسمزی بچه تاسماهیان ایرانی قرار گرفته در شوری‌های مختلف هستند که در این بین متابولیت‌های اسیدفوماریک، متیونین و اسیدهای آمینه شاخه‌دار از مهمترین متابولیت‌های مقاومت به شوری در بچه تاسماهی ایرانی می‌باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از Flaminia Cesar Marincola، سرکار خانم دکتر ساحل سلطان کریمی و آقای دکتر روح‌اله رحیمی به پاس همکاری علمی ایشان سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

- Allen P.J., Mitchell Z.A., DeVries R.J., Aboagye D.L., Ciaramella M.A., Ramee S.W., Stewart H.A., Shartau R.B. 2014. Salinity effects on Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell, 1815) growth and osmoregulation. *Applied Ichthyology*, 30: 1229-1236.
- Aru V., Pisano M.B., Savorani F., Engelsens S.B., Cosentino, S., Cesare Marincola F. 2016. Metabolomics analysis of shucked mussel's freshness. *Food Chemistry*, 205: 58-65.
- Bone Q., Marshall N.B. 1982. *Biology of Fishes*. Chapman and Hall press. New York, USA. 253 P.
- Boothroyd M., Whillans T., Wilson C.C. 2017. Translocation as a mitigation tool: Demographic and genetic analysis of a reintroduced lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* Rafinesque, 1817) population. *Applied Ichthyology*, 34(2): 348-363.
- Bundy J.G., Davey M.P., Viant M.R. 2009. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics*, 5: 3-21.

- Bystriansky J.S., Frick N.T., Ballantyne J.S. 2007. Intermediary metabolism of Arctic char *Salvelinus alpinus* during short-term salinity exposure. *Journal of Experimental Biology*, 210: 1971-1985.
- Calder P.C. 2006. Branched-chain amino acids and immunity. *Journal of Nutrition*, 136: 288-293.
- Chang E.W.Y., Loong A.M., Wong W.P., Chew S.F., Wilson J.M., Ip Y.K. 2007. Changes in tissue free amino acid contents, branchial Na^+/K^+ -ATPase activity and bimodal breathing pattern in the freshwater climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch), during seawater acclimation. *Journal of Experimental Zoology*, 307: 708-723.
- Chesley A., Richard A., Howlett G., Heigenhauser J.F., Hultman E., Lawrence L.S. 1998. Regulation of muscle glycogen lytic flux during intense aerobic exercise after caffeine ingestion. *American Journal of Physiology*, 275(44): 596-603.
- Choi I.Y., Seaquist E.R., Gruetter R. 2003. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *Journal of Neuroscience Research*, 72: 25-32.
- Evans D.H., Piermarini P.M., Choe K.P. 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *American Physiological Society*, 85(1): 97-177.
- Fernández-Alacid L., Sanahuja I., OrdóñezGrande B., Sánchez-Nuño S., Herrera M., Ibarz A. 2019. Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress-attenuating diets: Correlations between plasma and mucus. *Aquaculture*, 499: 185-194.
- Finney S.T., Isely J.J., Cooke D.W. 2006. Upstream Migration of Two Pre-Spawning Shortnose Sturgeon Passed Upstream of Pinopolis Dam, Cooper River, South Carolina. *Southeastern Naturalist*, 5(2): 369-375.
- Folch J., Less M., Stanley G.H.S. 1975. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- German J.B., Hammock B.D., Watkins S.M. 2005. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics*, 1: 3-9.
- Gershanovich A.D., Vaitman G.A., Vladimirsky S.S., Rubtsova T.E. 1991. Changes in chemical composition of muscle in young hybrids between Russian Sturgeon *Acipenser guldenstadti* Brand×beluga *Huso huso*. under different levels of salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100: 667-73.
- Hajirezaee S., Mirvaghefi A.R., Farahmand H., Agh N. 2018. A metabolic approach to understanding adaptation to sea water by endangered Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Fingerlings. *Aquaculture Research*, 49: 341-351.
- Hendry C., Haxton T., Friday M., Cano T. 2015. Assessing the Magnitude of Effect of Hydroelectric Production on Lake Sturgeon Abundance in Ontario. *North American Journal of Fisheries Management*, 35(5): 930-941.

- Hwang P.P., Lee T.H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148: 479-497.
- Kultz D., Jress D. 1993. Biochemical characterization of isolated branchial mitochondria-rich cells of *Oreochromis mossambicus* acclimated to fresh water or hyperhaline sea water. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 163(5): 406-412.
- Lankadurai B.P., Nagato E.G., Simpson M.J. 2013. Environmental metabolomics: An emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environmental Reviews*, 21(3): 180-205.
- Marshall W.S. 2002. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 264-283.
- Mommsen T.P., French C.J., Hochachka P.W. 2011. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Canadian Journal of Zoology*, 58(10): 1785-1799.
- Rito J., Viegas I., Pardal M.A., Metón I., Baanante I.V., Jones J.G. 2019. Utilization of glycerol for endogenous glucose and glycogen synthesis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A potential mechanism for sparing amino acid catabolism in carnivorous fish. *Aquaculture*, 498: 488-495.
- Sadok S., Hetli M., El Abed A., Uglow R.F. 2004. Changes in some nitrogenous compounds in the blood and tissues of freshwater pikeperch (*Sander lucioperca*) during salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 138: 9-15.
- Sangiao-Alvarellos S., Laiz-Carrión R., Guzmán J.M., Martín del Río M.P., Miguez J.M., Mancera J.M., Soengas J.L. 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285: 897-907.
- Schneider S.M., Joly F., Gehhardt M.F., Badran A.M., Myara A., Thuillier F., Coudray-Lucas C., Cynober L., Trivin F., Messing B. 2006. Taurine status and response to intravenous taurine supplementation in adults with short-bowel syndrome undergoing long-term parenteral nutrition: a pilot study. *British Journal of Nutrition*, 96(2): 365-70.
- Schreck C.B., Tort L., Farrell A.P., Brauner C.J. 2016. *Biology of Stress in Fish. The Concept of Stress in Fish*. In *Fish Physiology*, Academic Press, (Vol. 35). San Diego, CA, USA. 602 P.
- Soltan Karimi S., Kalbasi M.M. 2018. Effect of water filters containing silver nanoparticles during incubation on changes in lactate metabolites and glutathione peroxidase and lactate dehydrogenase enzymes in Persian sturgeon

- embryos *Acipenser persicus*. Physiology and Aquatic Biotechnology, 6(1): 137-155. (In Persian)
- Sreekumar A., Poisson L.M., Rajendiran T.M., Khan A.P., Cao Q., Yu J., Laxman B., Mehra R., Lonigro R.J., Li Y., Nyati M.K., Ahsan A., Kalyana-Sundaram S., Han B., Cao X., Byun J., Omenn G.S., Ghosh D., Pennathur S., Alexander D.C., Berger A., Shuster J.R., Wei J.T., Varambally S., Beecher C., Chinnaiyan A.M. 2009. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. Nature, 457(7231): 910-914.
- Subhash Peter M.C., Rejitha V. 2011. Interactive effects of ambient acidity and salinity on thyroid function during acidic and post-acidic acclimation of air-breathing fish (*Anabas testudineus* Bloch). General and Comparative Endocrinology, 174(2): 175-83.
- Walton M.J., Cowey C.B. 1977. Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comparative Biochemistry and Physiology, 57: 143-150.
- Wenwen J., Xiangli T., Ziheng F., Li L., Shuanglin D., Haidong L., Kun Zh. 2019. Metabolic responses in the gills of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) exposed to salinity stress using NMR-based metabolomics. Science of the Total Environment, 653: 465-474.
- Wu H., Liu J., Lu Z., Xu L., Ji C., Wang Q., Zhao J. 2017. Metabolite and gene expression responses in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to reduced salinities. Fish and Shellfish Immunology, 63: 417-423.
- Wu H., Liu X., Zhang X., Ji C., Zhao J., Yu J. 2013. Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities. Aquatic Toxicology, (136-137): 91-100.
- Yelamanchi S.D., Jayaram S., Thomas J.K., Gundimeda S., Khan A.A., Singhal A., Keshava Prasad T.S., Pandey A., Somani B.L., Gowda H. 2016. A pathway map of glutamate metabolism. Journal of Cell Communication and Signaling, 10(1):69-75.