تعیین الگوی پراکنش سلولهای کلراید آبشش در بچه ماهیان دو تابستانه آزاد خزر (*Salmo trutta caspius*) سازگار با آب شیرین

حلیمه رجبی؛ صابرخدابنده*؛ سهیلا فلاح و جمشید امیری مقدم

surp78@gmail.com

دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ۳۵۶

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۰

چکیده

این تحقیق در سال ۱۳۸۷ با هدف تعیین محل حضور سلولهای غنی از آنزیم Na^+,K^+-ATPase (سلولهای کلراید) و بررسی نحوهٔ پراکنش آنها در آبشش بچه ماهیان دو تابستانه آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* (هم سن با اوزان متفاوت ۵، ۱۵ و ۲۵ گرم) که در آب شیرین تکثیر و رشد یافته بودند، انجام گرفت. بافت‌شناسی آبشش با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و مکان‌یابی آنزیم **Na^+, K^+-ATPase** با استفاده از آنتی بادی **$IgG\alpha_5$** و تکنیک ایمونوهیستوشیمی انجام شد. به منظور شمارش سلولها در واحد سطح، تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری و فلورسنت توسط نرم‌افزار **Image Tools 2.1** بررسی گردید. حضور سلولهای فلوئورسنت در بافت آبششی در روی تیغه و رشته‌ها و کمان آبششی مشخص گردید. تعداد سلولهای کلراید رشته‌ای و مجموع سلولهای کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای ۱ میلیمترمربع از سطح آبشش، در هر سه وزن ۵، ۱۵، ۲۵ گرمی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما سلولهای کلراید تیغه‌ای در وزن ۵ گرم کاهش معنی‌داری نسبت به دو وزن دیگر داشت. همچنین درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید تیغه‌ای نسبت به کل مقطع آبششی، در وزن ۱۵ گرم و سلولهای کلراید رشته‌ای، در وزن ۵ گرمی بیش از سایر وزنها بود. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان بیان کرد که وزن تاثیر بسزایی در توانایی و قابلیت تنظیم اسمزی در ماهیان هم سن دارد و با توجه به مهاجرتی که به آب دریای خزر اتفاق خواهد افتاد بچه ماهیان با وزن بیشتر با تغییرات سلولهای کلراید از نظر تعداد و مکان، آمادگی مقابله با استرس شوری محیط جدید را خواهند داشت. همچنین در صورتیکه همین ماهی‌ها تا اوزان بالاتری در آب شیرین نگهداری شوند سازش آنها در جهت آب شیرین بیشتر تقویت می‌شود.**

لغات کلیدی: تنظیم اسمزی، *Salmo trutta caspius*، Na^+,K^+-ATPase، $IgG\alpha_5$، دریای خزر

*نویسندهٔ مسئول

مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*, Kessler 1877) از جمله ماهیان بومی و مهاجر (آنادرموس) حوزه جنوبی دریای خزر می‌باشد که از ارزش غذایی و اقتصادی ویژه‌ای برخوردار است (کازانچف، ۱۳۷۱). از جمله راههای جلوگیری از انقراض این گونه مهم و نادر، تکثیر مصنوعی و رهاسازی آن به دریا می‌باشد که توسط مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت انجام می‌شود. در حال حاضر رهاسازی بچه ماهیان در اوزان مختلف ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ گرم انجام می‌گیرد. یکی از مهمترین نکات در رهاسازی، وزن ماهی می‌باشد. بطوریکه هر چه ماهی در وزن بالاتری رهاسازی شود درصد بقاء و مهاجرت به دریا بیشتر می‌شود (بارانیکووا، ۱۳۷۹). بطور کلی در آزاد ماهیان بیان شده که اندازه بدن، فاکتور اصلی درگسترش توان تحمل شوری و تنظیم اسمزی می‌باشد (Nordile *et al*., 2005; Evans *et al*., 1989; Cote *et al*., 1996).

تنظیم اسمزی، مکانیسم حفظ هموستازی مایعات درونی بدن و مسئول حفظ و کنترل اسمولاریته یا فشار اسمزی پلاسما می‌باشد (Jurd, 2000). تنظیم‌اسمزی در ماهی‌ها، توسط پوست، آبشش، کلیه و دستگاه گوارش انجام می‌شود (Eldon, 2003). از این میان آبشش مهمترین جایگاه تبادل یونی و تنظیم اسمزی بین بدن و محیط بشمار می‌رود (Jurd, 2000).

در اپی‌تلیوم آبششی سلولهای کلراید مهمترین جایگاه تبادلات یونی هستند. این سلولها علاوه بر تنظیم تعادل اسیدی- بازی مسئول ترشح یونها در آب شور و جذب یونها در آب شیرین بشمار می‌روند (Wood & Marshall, 1994).

تحقیقات نشان داده که آنزیم Na^+,K^+-ATPase نقش محوری در انتقال یونی سلولهای کلراید ایفا می‌کند. پروتئین α این پمپ دارای فعالیت ایمنیایی است و ثابت شده است که شدت آن وابسته به فعالیت آنزیم مربوطه است (Eldon, 2003). از آنتی‌بادی $IgG\alpha_5$ جهت مکان‌یابی سلولهای کلراید و در واقع برای ایمونولوکالیزه نمودن آنزیم Na^+,K^+-ATPase و همچنین پی‌بردن به تغییرات تعداد، اندازه و نحوهٔ پراکنش سلولهای کلراید در بافتهای مختلف برای پی‌بردن به توان تنظیم اسمزی آنها در حد وسیعی استفاده شده است (Nebel *et al*., 2005; Khodabandeh *et al*., 2005; Evans *et al*., 2005).

اخیراً مطالعات گوناگونی در مورد توانایی و قابلیت تنظیم اسمزی در آزاد ماهیان خزر در اوزان مختلف صورت گرفته که بیشتر با توجه به میزان مرگ و میر آنها پس از مواجه با شوری و با اندازه‌گیری یونهای پلاسما بوده و از تکنیک ایمونوهیستوشیمی در این زمینه استفاده نشده است.

سالانه میلیون‌ها بچه ماهی دو تابستانه دریای خزر که معمولاً دارای وزن متفاوتی بین ۵ تا ۳۰ گرم می‌باشند در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی کلاردشت تولید و به دریای خزر رهاسازی می‌شوند. اگر چه این بچه ماهیان هم سن هستند ولی تفاوت وزن و اندازه در آنها، می‌تواند سبب تفاوت توانایی آنها برای مقابله با استرس‌های بعد از رهاسازی، بخصوص شوری آب باشد. لذا تحقیق حاضر به منظور سنجش آمادگی این بچه ماهیان برای انجام تبادلات یونی در اوزان مختلف (۵، ۱۵ و ۲۵ گرم) با استناد به الگوی پراکنش سلولهای کلراید انجام گرفت.

مواد و روش کار

این تحقیق در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت در سال ۱۳۸۷ روی بچه ماهیان ۵ ، ۱۵ و ۲۵ گرم هم سن (دو تابستانه) آزاد دریای خزر انجام شد. ابتدا ۶ عدد ماهی تکثیر و پرورش یافته در آب شیرین رودخانه، که آماده برای رهاسازی در مصب رودخانه‌ها بودند، بصورت کاملاً تصادفی از هر وزن (۵ ، ۱۵ و ۲۵ گرم) بطور جداگانه انتخاب شدند. پس از بیهوشی ماهیان توسط پودر گل میخک، آبشش آنها جهت انجام مطالعه بافت‌شناسی کلاسیک و ایمونوهیستوشیمی، بطور کامل جدا گردید و به مدت ۴۸ ساعت در بوئن تثبیت شد. پس از آن نمونه‌های تثبیت شده به آزمایشگاه بافت‌شناسی و مطالعات میکروسکوپیک دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس نور منتقل گردید و پس از طی مراحل مختلف بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند (خوشنود و همکاران، ۱۳۸۷؛ خدابنده و تقی‌زاده، ۱۳۸۵؛ Evans *et al*., 2005).

نمونه‌ها بعد از ۴۸ ساعت از بوئن خارج و پس از آبگیری در داخل پارافین مایع (داخل آون با دمای ۵۸ درجه سانتیگراد)

قرار داده و در نهایت در پارافین قالب‌گیری شدند (Khodabandeh *et al*., 2005). در تعدادی از نمونه‌ها دو کمان خارجی آبشش ابتدا جداسازی و سپس در پارافین قالب‌گیری شدند.

از قالب‌ها بوسیله میکروتوم (ساخت شرکت دید سبز) برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه، و روی لامهای با پوشش Poly-L-Lysin قرار داده شدند. برای مطالعه ساختار بافت‌شناسی بخش‌های مختلف کمانهای آبششی، لامها بوسیله هماتوکسلین- ائوزین رنگ آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری Micros مطالعه شدند.

ایمونولوکالیزه نمودن آنزیم Na^+,K^+-ATPase با استفاده از آنتی بادی $IgG\alpha_5$ و میکروسکوپ نوری فلوئورسانس انجام گرفت. برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، لامها بعد از پارافین‌زدایی و آبگیری در الکل اتانول بترتیب ۱۰ دقیقه در محلول PBS (Phosphate Buffered Saline)، ۱۰ دقیقه در محلول A (۲۵۰ سی‌سی PBS ده میلی مول + ۲/۱۸ گرم کلرید سدیم) و ۲۰ دقیقه در محلول B (۵۰ درصد PBS و ۵۰ درصد Regiler) قرار داده شدند (Khodabandeh *et al*., 2009a).

سپس لامها به مدت ۲ دقیقه در PBS آب کشیده شده و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب، بطوری که سطح برش‌ها بطرف بالا باشد، چیده شدند. روی هر لام ۲-۳ قطره از آنتی بادی $IgG\alpha_5$ رقیق شده در PBS [(۵۰ درصد آنتی‌بادی + ۵۰ درصد محلول C (۲ سی‌سی محلول B +۸ سی‌سی آب مقطر)] اضافه گردیده، به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد. بعد از سپری شدن این دو ساعت، لامها به مدت ۲ دقیقه در محلول PBS شستشو داده می‌شوند. آنگاه ۲-۳ قطره از آنتی بادی FITC روی هر لام اضافه شده (۹۸۵µl آنتی بادی + ۱۵µl محلول C) و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شدند. سپس لامها در PBS آب کشیده شده و مونتاژ شدند. جهت پی بردن به درستی کارکرد این آنتی بادی به تعدادی از لامها، آنتی بادی اول اضافه نشد ولی آنتی‌بادی دوم اضافه شد (لامهای ایمونوهیستوشیمی شاهد)، لذا این لامها نباید فلوئورسانسی داشته باشند. کلیه لامها بعد از قرار دادن لامل روی آنها در جعبه‌های مخصوص چیده شده و برای حفظ خواص فلوئورسانسی در جای کاملاً تاریک نگه‌داری شدند.

لامها توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس (Nikon,TE 2000S) مشاهده و عکسبرداری شدند. تمام اندازه‌گیری‌ها توسط نرم‌افزار Image Tools 2.1 انجام شد. سلولهای کلراید در سطح ۱ میلیمترمربع بافت آبششی شمارش شدند و درصد سطح اشغالی توسط سلولهای کلراید نیز محاسبه گردیدند (Shikano & Fujio, 1998). تمامی مقادیر بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 11.5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

مشاهده بافت‌شناسی نشان داد که آبشش در بچه ماهیان آزاد دریای خزر از ۴ جفت کمان آبششی (Arch) در هر طرف سر تشکیل شده است. هر کدام از این کمان‌ها حامل رشته‌های آبششی (Filament) متعددی می‌باشند (شکل ۱-۱). سپتوم برانشی در بخش میانی کمان آبششی و در پایه رشته‌ها مشاهده می‌شود و دارای بافتی از جنس غضروف است (شکل ۱-۱ و شکل ۲-۱). در برش طولی هر رشته، یک محور مرکزی شامل رگهای خونی و همچنین دو ردیف تیغه‌های آبششی (Lamellae) بصورت عمود بر محور طولی رشته آبششی مشاهده می‌شود. همچنین تعداد زیادی سلولهای خونی در داخل رگ‌ها قابل مشاهده است (شکل ۳-۱). رشته‌ها و تیغه‌های آبششی توسط بافت پوششی تخصص یافته‌ای پوشیده شده است (شکل ۴-۱). تیغه‌ها ساختار عمومی خود را نشان داده و بافت پوششی آنها دارای سلولهای سنگفرشی، سلولهای موکوسی و سلولهای کلراید می‌باشد (شکل ۵-۱). سلولهای کلراید عموماً در نواحی مختلف بافت آبشش در ناحیه پایه تیغه و روی تیغه (شکل ۶-۱) و در ناحیه بین تیغه‌ای (شکل ۵-۱) مشاهده شدند. تیغه‌ها توسط اپی‌تلیوم نازک سنگفرشی تک سلولی پوشیده شده، در برش طولی هر تیغه علاوه بر سلولهای سنگفرشی، سلولهایی به نام سلولهای پیلار دیده می‌شوند. این سلولها ستونی بوده و سبب دور نگه داشتن اپی‌تلیوم دو سوی تیغه و نیز تشکیل حفره‌های خونی در تیغه هستند (شکل ۶-۱).

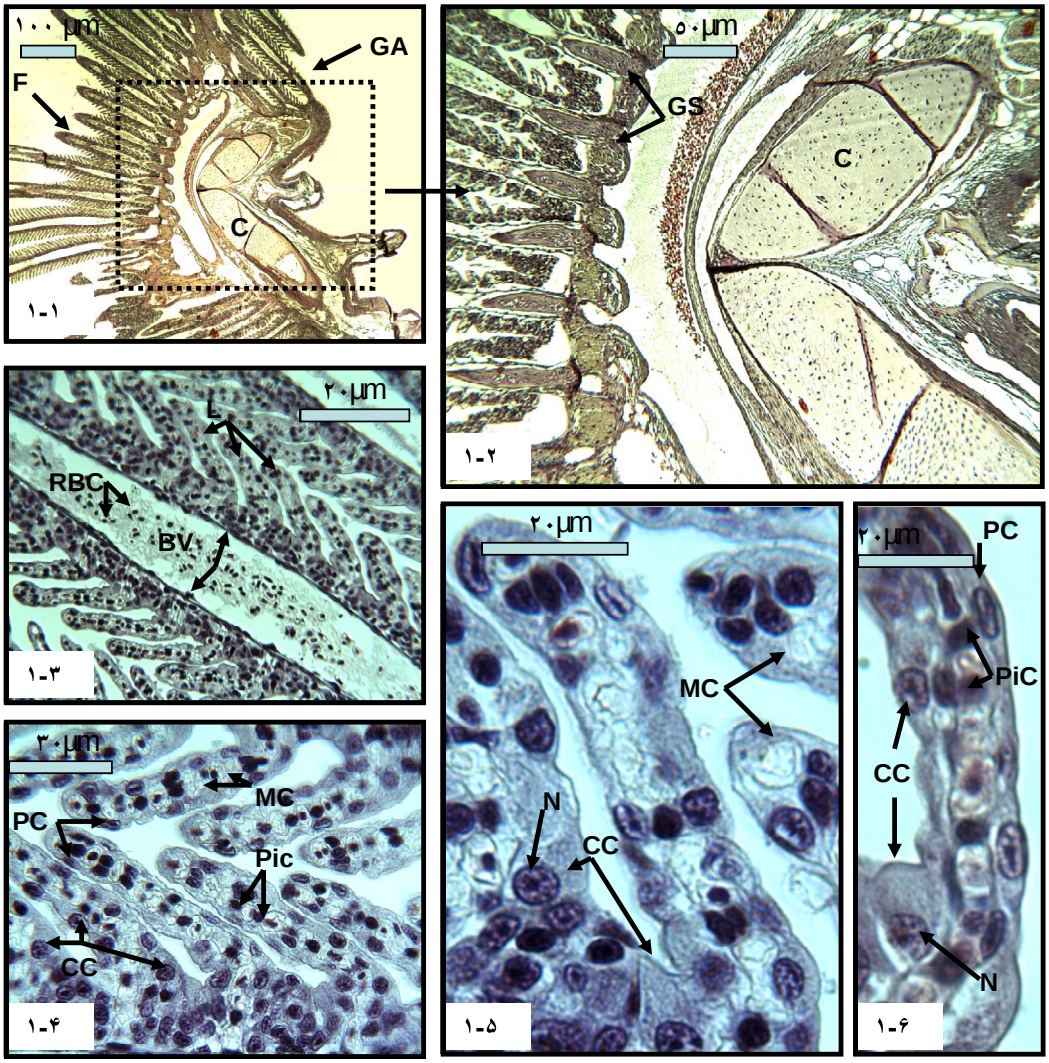
در روش ایمونوهیستوشیمی، آنتی‌بادی $IgG\alpha_5$ روی آنزیم Na^+,K^+-ATPase قرار گرفته و با حضور آنتی‌بادی دوم (FITC) این آنزیم را در نور فلوئورسنت بصورت زرد مایل به سبز نشان می‌دهد. مطالعه ایمونوفلوئورسانس در لامهای ایمونوهیستوشیمی شاهد نشان داد که سلولهای کلراید بدون

حضور آنتی‌بادی اول هیچگونه فلوئورسانسی از خود نشان نمی‌دهند، اما سلولهای خونی بصورت اتوفلورسانس قابل رؤیت هستند (شکل ۱-۲). در لامهای ایمونوهیستوشیمی دارای هر دو آنتی‌بادی، سلولهای کلراید فلورسانس در بخشهای مختلف بافت آبشش از قبیل: تیغه، رشته و کمان آبششی در ماهی آزاد دریای خزر مشاهده شدند (شکل ۲-۲ و شکل ۳-۲). در برش عرضی از بافت آبشش نیز سلولهای ایمونوفلوئورسانس نشان داده شده است که بیشتر پراکندگی این سلولها در اطراف سینوس وریدی مرکزی می‌باشد (شکل ۴-۲ و شکل ۵-۲). این سلولها به شکل کروی تا تخم‌مرغی دیده می‌شوند (شکل ۶-۲). نحوهٔ پراکندگی سلولها در هر سه وزن مورد مطالعه، مشابه می‌باشد (شکل ۷-۲، شکل ۸-۲ و شکل ۹-۲).

نتایج شمارش سلولهای کلراید در آبشش بچه ماهیان آزاد خزر هم سن و با اوزان متفاوت، نشان داد که در هر میلیمترمربع از سطح مقطع بافت آبششی در وزن ۵ گرم: حدود ۲۰۵۳ سلول کلراید و در وزن ۱۵ گرم: حدود ۲۸۲۵ سلول کلراید و در وزن ۲۵ گرم: حدود ۳۱۶۶ سلول کلراید وجود دارد، که بیشترین تعداد آنها روی تیغه قرار داشته است. یعنی از این تعداد سلول، حدود ۱۰۳۰ سلول کلراید تیغه‌ای در وزن ۵ گرم، ۲۰۶۳ سلول کلراید تیغه‌ای در وزن ۱۵ گرم و ۲۱۶۵ سلول کلراید تیغه‌ای در وزن ۲۵ گرم وجود داشت (نمودار ۱).

همچنین در دو وزن ۱۵ و ۲۵ گرمی، تعداد و درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای غنی از آنزیم Na^{+},K^{+}-ATPase در بخش تیغه‌ای آبشش بطور معنی‌داری بیش از بخش رشته بوده است، در حالیکه تفاوتی در تعداد و درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید ناحیه رشته‌ای و تیغه‌ای در وزن ۵ گرم مشاهده نشد (نمودار ۱ و ۲).

مقایسه تعداد سلولهای کلراید تیغه‌ای در سه وزن نشان‌دهندهٔ افزایش معنی‌دار تعداد سلولهای کلراید در وزن ۱۵ و ۲۵ گرمی نسبت به وزن ۵ گرمی بوده است. البته تعداد کل سلولهای کلراید (مجموع سلولهای کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای) و تعداد سلولهای کلراید رشته‌ای اختلافی را در سه وزن نشان نداد (نمودار ۳). درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید در بافت آبششی به گونه‌ای دیگر بود، زیرا که درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید تیغه‌ای و درصد کل سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید در وزن ۱۵ گرم بیش از دو وزن دیگر بوده و درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید رشته‌ای در وزن ۵ گرم نسبت به دو وزن دیگر افزایش معنی‌داری داشته است (نمودار ۴).



شکل ۱: بافت‌شناسی کلاسیک آبشش بچه ماهی آزاد دریای خزر (رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین – ائوزین)

شکل ۱-۱: برش طولی از کمان آبششی و مشاهده موقعیت رشته‌های آبششی روی کمان

شکل ۱-۲: تصویر سپتوم برانشی و بافت غضروفی در بخش میانی کمان آبششی و در پایه رشته‌ها

شکل ۱-۳: برش طولی یک رشته آبششی

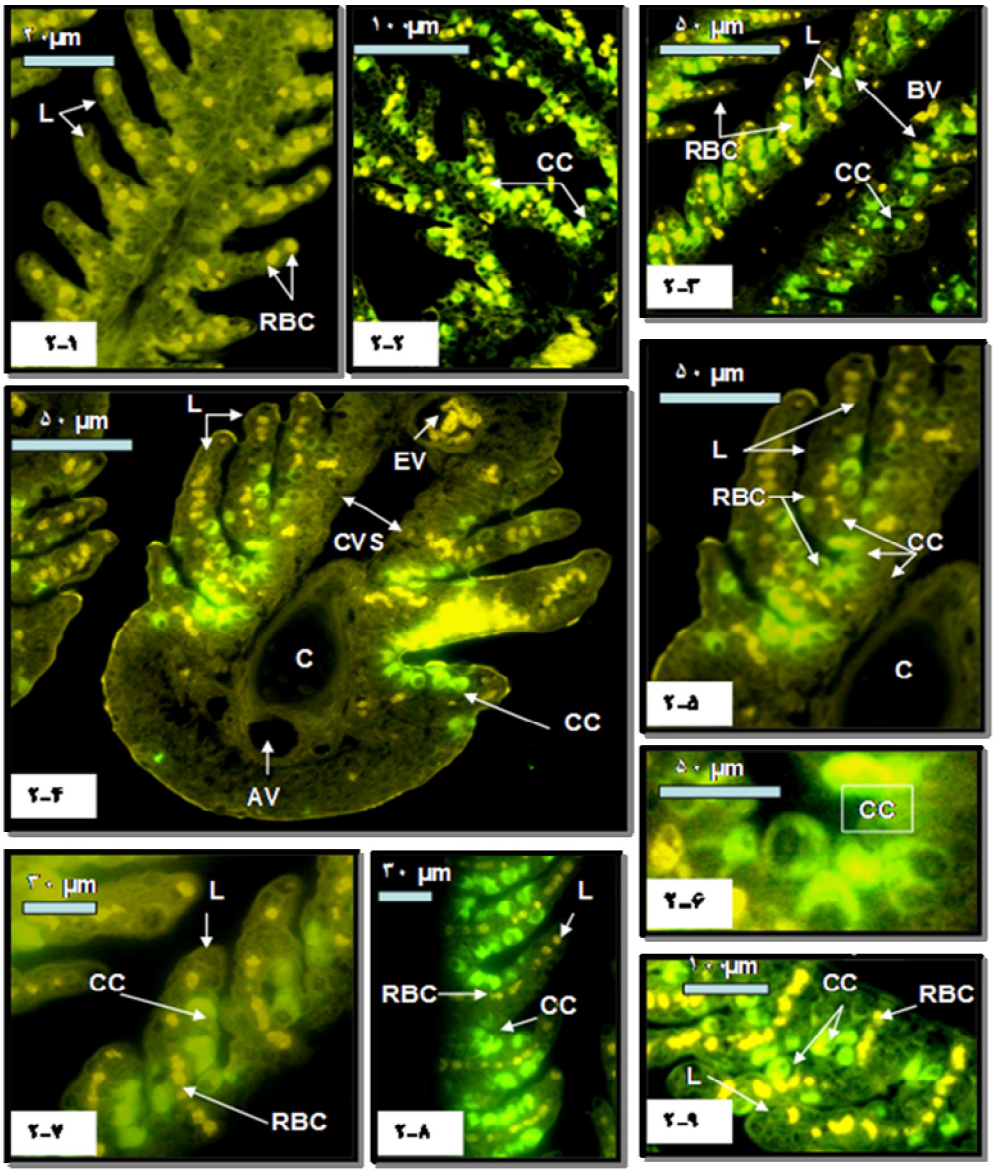
شکل ٤-۱: سلولهای تشکیل دهندهٔ اپی‌تلیوم آبششی: سلولهای کلراید، سلولهای سنگفرشی و سلولهای موکوسی و بیلار

شکل ۵-۱: نمای نزدیک از سلول موکوسی و همچنین موقعیت سلول کلراید در ناحیه بین تیغه‌ای

شکل ٦-۱: سلولهای کلراید در ناحیه پایه تیغه و در روی تیغه

اختصارات:

BV: رگ خونی (Blood Vessel)؛ C: غضروف (Cartilage)؛ CC: سلول کلراید (Chloride Cell)؛ F: رشته آبششی (Filament)؛ GA: کمان آبششی (Gill Arch)؛ GS : سپتوم آبشش (Gill Septup)؛L: تیغه آبششی (Lamellae)؛ M: سلول موکوسی (Mucus Cell)؛ N: هسته سلول (Nucleus)؛ PC: سلول سنگفرشی (Pavment Cell)؛ PiC: سلول پیلار (Pillar Cell)؛ RBC: گلبولهای قرمز خونی (Red Blood Cell)

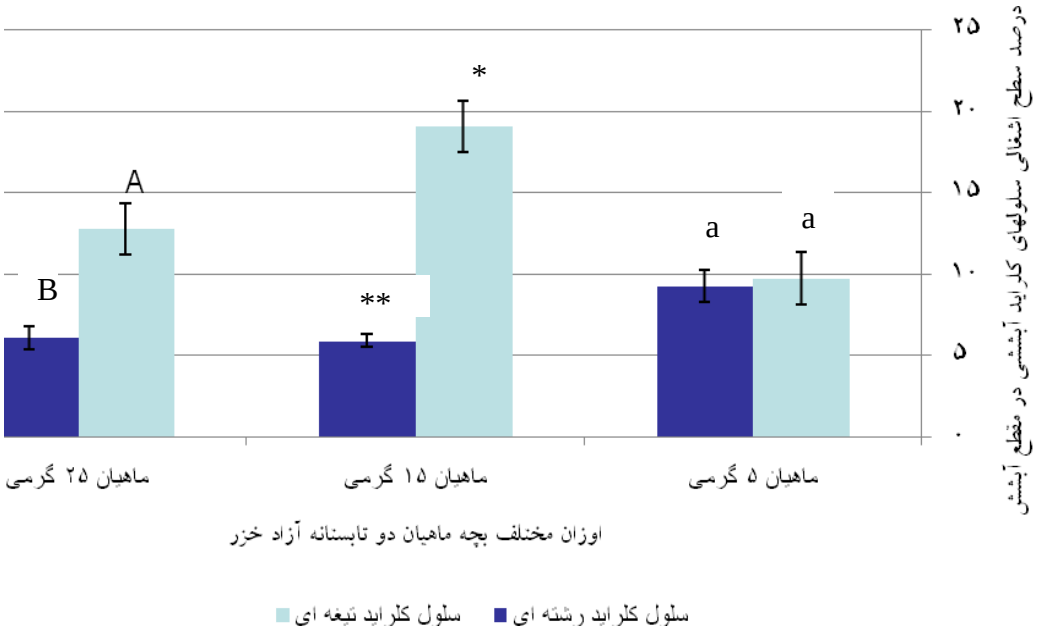


شکل ۲: مکان یابی سلول‌های غنی از آنزیم Na^+,K^+-ATPase در بچه ماهی آزاد خزر (به روش ایمونو هیستوشیمی)

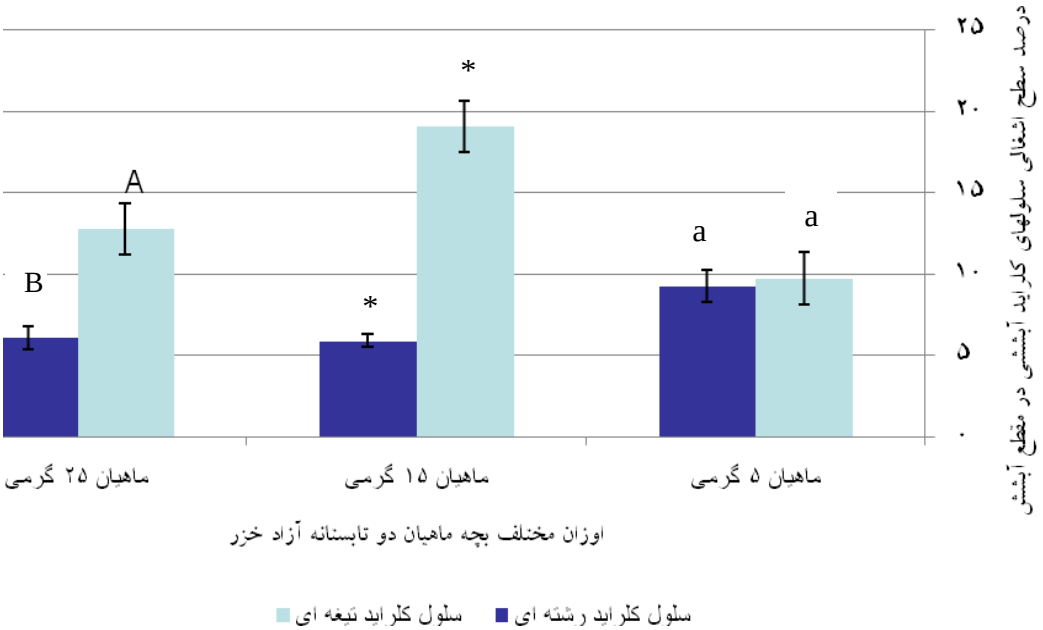
شکل۱-۲: برش طولی رشته آبششی (نمونه شاهد).
شکل۲-۲: با افزودن آنتی کور $IgG\alpha_5$ سلولهای کلراید به رنگ سبز درخشان در نواحی مختلف ظاهر شده‌اند.
شکل۳-۲: برش طولی رشته و تیغه‌ها و مشاهده سلولهای کلراید در روی تیغه و در پایه تیغه و در ناحیه بین تیغه‌ای .
شکل٤-۲: برش عرضی از بافت آبششی. عمده پراکنش سلولهای کلراید در اطراف سینوس وریدی مرکزی دیده می‌شود.
شکل٥-۲: نمای نزدیک از برش عرضی
شکل٦-۲: در این تصویر شکل سلولهای کلراید که بصورت تخم مرغی است کاملاً از نمای نزدیک نشان داده شده است.
شکل۷-۲: پراکنش سلولهای کلراید در وزن ۵ گرمی
شکل۸-۲: پراکنش سلولهای کلراید در وزن ۱۵ گرمی
شکل۹-۲: پراکنش سلولهای کلراید در وزن ۲۵ گرمی

اختصارات:

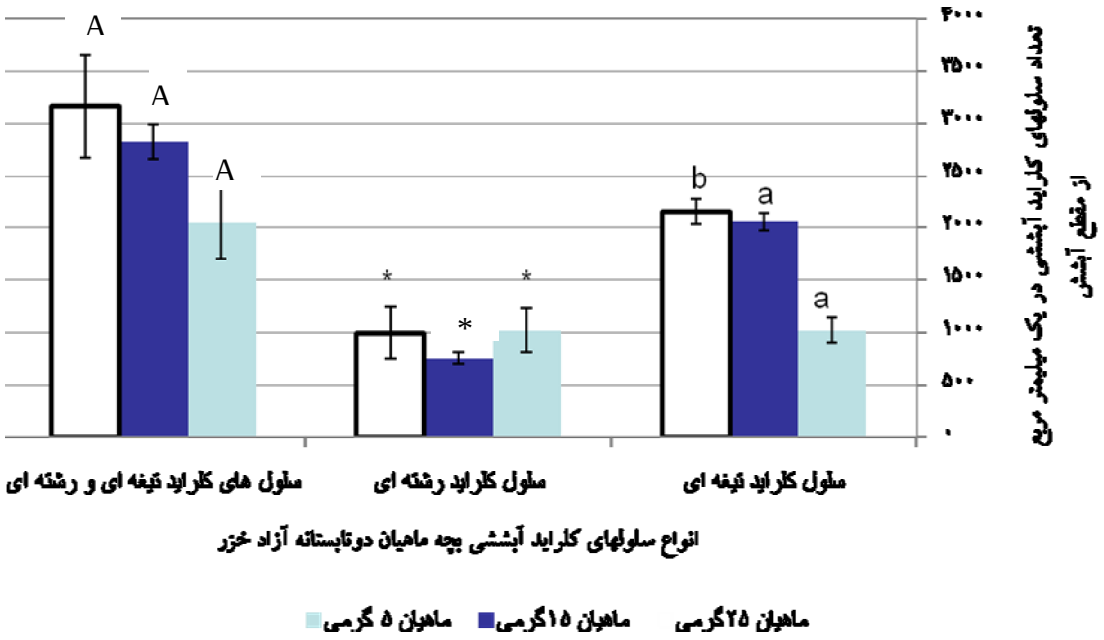
AV: رگ خونی آوران (Afferent vessel)؛ BV: رگ خونی (Blood Vessel)؛ C: غضروف (Cartilage)؛ CC: سلول کلراید (Chloride Cell)؛ CVS: سینوس وریدی مرکزی (Central Venous Sinus)؛ EV: رگ خونی وابران (Efferent Vessel)؛ L: تیغه آبششی (Lamellae)؛ RBC: گلبولهای قرمز خونی (Red Blood Cell)



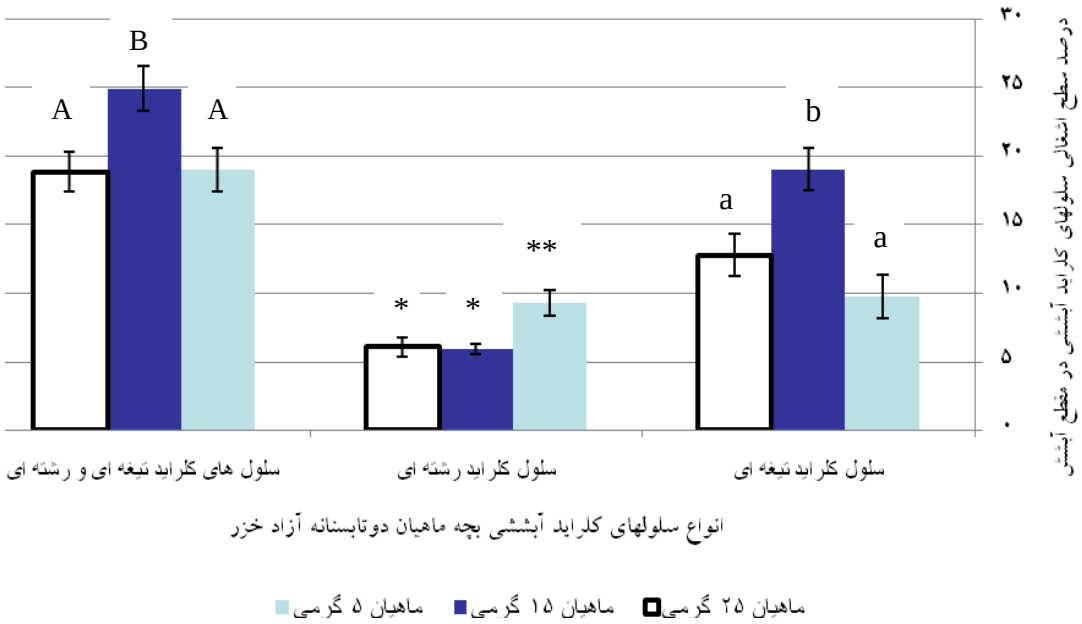
نمودار ۱: تفاوت بین تعداد سلولهای کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای در یک میلیمترمربع از سطح آبشش در هر یک از اوزان ۵، ۱۵ و ۲۵ گرم (حروف و علائم نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $(P<0.05)$ بین دو گروه سلولهای کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای در هر وزن می‌باشد)



نمودار ۲: تفاوت بین درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای در یک میلیمترمربع از سطح آبشش در هر یک از اوزان ۵، ۱۵ و ۲۵ گرم (حروف و علائم نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $(P<0.05)$ بین دو گروه سلولهای کلراید تیغه‌ای و رشته‌ای در هر وزن می باشد)



نمودار ۳: تفاوت تعداد سلولهای کلراید در یک میلیمترمربع از سطح آبشش در هر یک از اوزان ۵، ۱۵ و ۲۵ گرم (حروف و علائم نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $(P<0.05)$ بین سه گروه وزنی می باشد)



نمودار ٤: تفاوت بین درصد سطح اشغال شده توسط سلولهای کلراید در یک میلیمترمربع از سطح آبشش در هر یک از اوزان ۵، ۱۵ و ۲۵ گرم (حروف و علائم نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $(P<0.05)$ بین سه وزنی می‌باشد)

بحث

در تصاویر بافت‌شناسی، جمعیت‌های سلولهای کلراید در ناحیه تیغه‌ای و در ناحیه رشته‌ای (در بخش پایه تیغه و در ناحیه بین تیغه‌ای و در سایر نواحی رشته) مشاهده شدند. نتایج سایر محققین روی گونه‌های مختلف ماهیان و در شوری‌های متفاوت نیز بیانگر حضور سلولهای کلراید هم در بخش تیغه‌ای و هم در بخش رشته‌ای آبشش بوده است (خوشنود و همکاران، ۱۳۸۷؛ خدابنده و تقی‌زاده، ۱۳۸۵؛ Khodabandeh *et al*., 2009a). این در حالی است که در برخی مطالعات انجام گرفته بر روی گونه‌های دیگر از قبیل: قزل‌آلای رنگین کمان (Witters *et al*., 1996)، ماهی Paddle fish (*Polydon spathula*) (Krayushkina *et al*., 2000) و ماهی gilthead sea bream (*Sparus auratus*)، در آب شیرین سلولهای کلراید تنها در روی رشته حضور داشته و انتقال به شوری های مختلف تاثیر معنی داری در پراکنش و جایگاه سلولهای کلراید نداشته است (Carrion *et al*., 2005).

سلولهای دارای ایمونوفلورسانس همان سلولهای کلراید بوده که در بخش‌های مختلف بافت آبشش با استفاده از آنتی‌بادی $IgG\alpha_5$ مکان‌یابی شدند. بخش قاعده‌ای– جانبی این سلولها، دارای ایمونوفلورسانس قوی است که نشان‌دهندهٔ حضور آنزیم Na^+,K^+-ATPase در این بخش می‌باشد (Shikano & Fujio, 1998; Khodabandeh *et al*., 2009a & 2009b) مانند تحقیقات انجام شده روی سایر گونه‌ها، در تحقیق حاضر تطابق تصاویر بافت‌شناسی با ایمونوهیستوشیمی نشان داد که اگر چه در مطالعه بافت‌شناسی سلولهای کلراید بدلیل داشتن هسته درشت و سیتوپلاسم یکنواخت، رنگ گرفته با ائوزین قابل تشخیص هستند ولی با روش ایمونوهیستوشیمی سلولهای کلراید بصورت لامپ‌های روشنی نمایان شده و شناسایی و شمارش دقیق آنها را امکانپذیر می‌سازد (خوشنود و همکاران، ۱۳۸۷؛ Shikano & Fujio, 1998; Khodabandeh *et al*., 2009a & 2009b)

مقایسه تعداد سلولهای کلراید در اوزان مختلف، نشان‌دهندهٔ افزایش معنی‌دار تعداد، درصد سطح اشغال شده توسط آنها در بخش تیغه‌ای بافت آبششی نسبت به بخش رشته‌ای بافت آبشش است. این امر در ماهیان هم سن با وزن بیشتر یعنی در وزن ۱۵ و ۲۵ گرمی دیده می‌شود. این موضوع احتمالاً با نقش متفاوت این دو نوع سلول (سلولهای تیغه‌ای و سلولهای رشته‌ای) در محیطهای مختلف ارتباط دارد. به این صورت که سلولهایی که در ناحیه تیغه قرار گرفته‌اند نقش تنظیم اسمزی را بیشتر در آب شیرین بر عهده داشته و جایگاه جذب یونی هستند و سلولهایی که در ناحیه رشته قرار دارند بیشتر در تنظیم اسمزی در آب شور نقش داشته و جایگاه ترشح یون می‌باشند و این امر وابسته به فعالیت آنزیم Na^+,K^+-ATPase به همراه حضور یا عدم حضور کوترانسپورتر NKCC و کانال دفع یونی CFTR می‌باشد (Shikano & Fujio, 1998; Khodabandeh *et al*., 2005 & 2009b).

Pisam و Rambourg (۱۹۹۱) نیز دو نوع از سلولهای کلراید را براساس جایگاه و شکل و ویژگی‌های فراساختاری در گونه‌های سازگار شده با آب شیرین متمایز نمودند. آنها بیان کردند که یک نوع سلول، سلولهای کلراید α، سلولهای طویلی هستند که در پایه تیغه قرار دارند، در حالیکه نوع دیگر ß تخم مرغی بوده و در ناحیه بین تیغه‌ای اپی‌تلیوم ابتدایی هستند (Pisam & Rambourg, 1991).

تحقیقاتی که روی ماهی کفال طلایی *Liza aurata* (Khodabandeh *et al*., 2009a) خامه ماهی *Oeochromis mossambicus* (Lee *et al*., 1996) و تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* سازگار شده با آب شیرین انجام شدند نیز نشان‌دهندهٔ حضور سلولهای کلراید روی تیغه بودند، که مشابه با نتایج تحقیق حاضر یعنی حضور تعداد زیاد سلولهای کلراید تیغه‌ای در محیط آب شیرین می‌باشد.

نتایج شمارش سلولهای کلراید در آبشش بچه ماهیان آزاد خزر هم سن و با اوزان متفاوت نشان داد که در هر میلیمترمربع از سطح بافت آبششی در وزن ۵ گرم، حدود ۲۰۵۳ سلول کلراید و در وزن ۱۵ گرم، حدود ۲۸۲۵ سلول کلراید و در وزن ۲۵ گرم، ۳۱۶۶ سلول کلراید وجود دارد. که بیشترین تعداد آنها روی تیغه قرار داشتند. براساس مطالعات انجام شده روی مار ماهی ۵۰۰ گرمی (*Anguila japonica*) ۱۰۰۶ سلول کلراید (Wong & Chan, 2001)، در آبشش باس دریایی ۲۴۰ گرمی (*Dicentrarchus labrax*)، ۶۲۵۰ سلول کلراید (Varsamos, 2002)، در آبشش تیلاپیای موزامبیک ۶۵ گرمی (*Oreochromis mossambicus*) ۶۲۳۳ سلول کلراید (Van der Heijden *et al*., 1997) شمارش گردید. بنابراین به نظر می‌رسد که تعداد سلولهای کلراید آبششی در گونه‌های مختلف، با توجه به میزان فعالیت‌های فیزیولوژیک آنها، در سنین و اوزان مختلف، متفاوت می‌باشد.

در بچه آزاد ماهیان خزر، با افزایش وزن در ماهیان هم سن، بر تعداد سلولهای کلراید تیغه‌ای در واحد سطح افزوده می‌شود ولی در سلولهای کلراید رشته‌ای تغییر معنی‌داری دیده نمی‌شود. اما چنین به نظر می‌رسد که بچه ماهیان ۵ گرمی براساس غریزه در جهت سازش به محیط شیرین بوده و در عین حال با روند رشد، خود را برای روبرو شدن با آب لب شور خزر آماده می‌کنند و در اوزان ۱۵ گرم یا کمی بیش و کم، آمادگی مهاجرت به خزر را دارند ولی با ماندن در محیط آب شیرین تا

وزن ۲۵ گرم، روند سازش به آب شیرین در آنها بیشتر نمود می‌کند که در تحقیقات مختلف نیز اشاره شده که با افزایش اندازه بدن ماهی، قابلیت تنظیم اسمزی آن افزایش می‌یابد (Nordile *et al*., 1989; Cote *et al*., 1996; Evans *et al*., 2005). همچنین در آزاد ماهیان، رسیدن به مرحله اسمولت در وزن خاصی روی می‌دهد که در گونه‌های مختلف متفاوت است (Robert, 2000).

در نتیجه مطابق با تحقیق حاضر بچه ماهیان آزاد خزر در وزن ۱۵ گرم با تغییر در تراکم و جایگاه سلولهای کلراید آبششی آمادگی لازم را نسبت به سایر اوزان جهت مهاجرت به آب شور یافته‌اند اما در وزن ۲۵ گرم کاهش تعداد سلولهای کلراید (مخصوصاً سلولهای کلراید فیلامنتی که در تنظیم اسمزی آب شور نقش خواهند داشت) به نظر می‌رسد که نوعی ضعف در این وزن در مواجهه با آب دریا می‌باشد همچنانکه مطابق نتایج Fraklin (۱۹۹۰) ماهی با تعداد کم سلول کلراید در بالانس یونی ناموفق بوده و این در حالی است که یک ماهی با تعداد سلول بیشتر قادر به سازگاری خوب با آب شور (۳۵ گرم در لیتر) خواهد بود. افزایش سلولهای کلراید با افزایش وزن، شاید به جهت آماده شدن برای مهاجرت به دریا به همراه افزایش فعالیت Na^+,K^+-ATPase می‌باشد. تفاوت بخشی از نتایج تحقیق حاضر با نتایج برخی ازتحقیقات انجام گرفته روی سالمونیدها می‌تواند شرایط ویژه خزر از نظر شوری و نوع ترکیبات یونی باشد. تحقیقی که در مورد وزن مناسب رهاسازی در آزاد ماهیان خزر توسط صیاد بورانی در سال ۱۳۸۵ انجام شده براساس مطالعه بافت‌شناسی، تغییرات هورمونی و تغییرات اسمولاریته بود که ماهیان ۱۰ تا ۲۰ گرمی را جهت رهاسازی مناسب دانستند. تحقیق حاضر براساس روش دقیق و جدید ایمونوهیستوشیمی نشان داد که بچه ماهیان ۵ گرمی بیشتر اختصاصات تنظیم یونی در آب شیرین را از خود نشان می‌دهند. در حالیکه در اوزان بیشتر (۱۵ گرمی) ساختار آبششی در جهت تنظیم یونی در آب لب شور و حتی شور را نشان داده و به نظر می‌رسد با رشد بیشتر بچه ماهیان در آب شیرین و رسیدن به وزن ۲۵ گرمی، مکانیسم‌های سازش به آب شیرین در آنها بیشتر تقویت می‌گردد.

منابع

بارانیکووا، الف. ۱۳۷۹. گزارش دوره آموزشی فیزیولوژی و بیوشیمی تاسماهیان، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۳۵صفحه.

خدابنده، ص. و تقی‌زاده، ز.، ۱۳۸۵. مکان‌یابی آنزیم-Na^+,K^+ ATPase و سلولهای یونوسیت در آبشش گربه ماهی(*Silurus glanis*) به روش ایمونو هیستوشیمی. فصلنامه پزشکی یاخته. سال هشتم. شماره ۱. صفحات ۴۵ تا ۵۲.

خوشنود، ز.؛ خدابنده، ص. و مسافر، س.، ۱۳۸۷. مکان‌یابی آنزیم Na^+,K^+-ATPase و سلولهای کلراید آبششی به روش ایمونوهیستوشیمی در بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، مجله علمی شیلات ایران، سال هفدهم، شماره ۴، صفحات ۱۷ تا ۲۶.

صیاد بورانی، م.؛ ابطحی، ب.؛ بهمنی، م. و کاظمی، ر.، ۱۳۸۵. تاثیر وزن بر قابلیت تطابق و تنظیم یونی در بچه ماهیان آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). مجله علمی شیلات ایران، دوره پنجم، شماره ۱و ۲، صفحات ۵۵ تا ۶۴.

کازانچف، ا. ان.، ۱۳۷۱. ماهیان دریای خزر و حوزه آبریزآن. مترجم: ابوالقایم شریعتی. ۶۴ صفحه.

Carrion R.L., Guerreiro P.M., Fuentes J., Canario A.V.M., Del Rio M.P.M. and Mancera J.M. 2005. Branchial osmoregulatory response to salinity in the Gilthead sea bream, *Sparus auratus*. Journal of Experimental Zoology,303:563-576.

Conte F.P., Wagner H.H., Fessler S. and Gnose C. 1996. Development of osmotic and ionic regulation in juvenile coho salmon. Comparative Biochemistry and Physiology, 18:1-15.

Eldon J.B., 2003. Regulation of renal and lower gastrointestinal function: role in fluid and electrolyte balance. Comparative Biochemistry and Physiology, 136:499-505.

Evans D.H., Piermarini P.M. and Choe K.P. 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiological Reviews, 85:97-177.

Franklin G.E., 1990. Surface ultrastructural changes in the gills of sockeye salmon (Teleostei: *Oncorhynchus nerka*) during seawater transfer: Comparison of successful and unsuccessful seawater adaptation. Journal of Morphology, 206:13-23.

Khodabandeh S., Chamantier-Daures M. and Chamantier G., 2005. Ultrastructural Studies and Na^+,K^+-ATPase Immunolocalization in the Antennal Urinary Glands of the Lobster *Homarus Gammarus* (Crustacea, Decapoda). Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 53:1203–1214.

Khodabandeh S., Shahriari M. and Abtahi B., 2009a. Changes in choloride cells abundance Na^+,K^+-ATPase immunolocali-zation and activity in gills of Golden Grey Mullet, *Liza aurata*, fry during adaptation to different salinities. Yakhteh Medical Journal, 11:49-54.

Khodabandeh S., Khoshnood Z. and Mosafer S., 2009b. Immunolocalization of Na^+,K^+-ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. Aquaculture Research, 40:329-336.

Krayushkina L.S., Semenova O.G., Panov A.A., Gerasimov A.A. and Ogorzalek A., 2000. Reaction of the osmoregulatory system of the Paddlefish *Polydon spathula* to marine environment. Zoologica Poloniae, 45:95-120

Jurd R.D., 2000. Instant notes in animal biology. Biological Science Publications. pp.140-145.

Lee T.H., Hwang P.P., Lin H.C. and Huang F.L., 1996. Mitochondria-rich cells in the branchial epithelium of the teleost, *Oreochromis mossambicus*, acclimated to various hypotonic environments. Fish Physiology and Biochemistry, 15:513-523.

Nebel C., Negre-Sadargues G., Blasco C. and Chamantier G., 2005. Morphofunctional ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Anatomy and Embryology, 209:193-206.

Nordile F.G., Szelistowski W.A. and Nordile W.C., 1982. Ontogenesis of osmotic regulation in salmonid fishes. Nature, 161:1218-1219.

Pisam M. and Rambourg A., 1991. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: An ultrastructural approach. International Review of Cell & Molecular Biology, 130:191-232.

Robert R.S., 2000. Encyclopedia of Aquaculture, Wiley-Interscience Publication. UK. 880P.

Shikano T. and Fujio Y., 1998. Immuno-localization of Na^+,K^+-ATPase in the branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and fresh water acclimation. Experimental Biology,201:3031-3040.

Van der Heijden A.J.H., Verbost P.M., Eygensteyn J., Li J., Wendelaar Bonga S.E. and Flik G., 1997. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to freshwater or sea water: Quantification by confocal laser scanning microscopy. Journal of Experimental Biology, 200:55-64.

Varsamos S., 2002. Tolerance rage and osmoregulation in hypersaline conditions in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Marine Biology, 82:1047-1048.

Witters H., Berckmans P. and Vangenechten C., 1996. Immunolocalization of Na^+,K^+-ATPase in the gill epithelium of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Cell and Tissue Research, 283:461-468.

Wong C.K. and Chan D.K., 2001. Effects of cortisol on chloride cells in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Endocrinology, 168:185-192.

Wood C.M. and Marshall W.S., 1994. Ion balance, Acid-base regulation and choloride cell function in the common killifish, *Fundulus heteroclitus* a euryhaline estuarine teleosts. Estauries. 17:34-52

Distribution pattern of branchial chloride cells in smolt *Salmo trutta caspius* fries of the Caspian Sea during freshwater adaptation

Rajabi H.; Khodabandeh S.*; Fallah S. and Amirimoghadam J.

Surp78@yahoocom

Department of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University,

P.O.Box: 14115-356 Noor, Iran

Received: September 2009 Accepted: April 2011

Keywords: Osmoregulation, *Salmo trutta caspius*, Na^+,K^+-ATPase, IgGα_5, Caspian Sea

Abstract

The immunolocalization of Na^+,K^+-ATPase rich-cells (chloride cells) and their distribution pattern in smolt *Salmo trutta caspius* fries of the Caspian Sea weighing 5, 15, 25 grams during freshwater adaptation was studied in 2008. Gill samples were fixed in Bouin's solution, and after hydration, the samples were paraffinaized and sectioned. Na^+,K^+-ATPase localization was performed using IgGα_5 antibody and immunohystoshimy technique. In order to count cells in gill area, immunofluorescence light microscopy pictures was analyzed using Image Tool 2.1 software. Chloride cells were found on gill arch, lamellae and filament. Filamentary chloride cells and their total number (chloride cells in lamellae and filament) had no significant difference in all 5, 15, 25g specimens but lamellar chloride cells in 5g fries was significantly decreased. Also, percentage of lamellae chloride cells in 15g specimens and those of filament chloride cells in 5g fries was higher than other weights. According to our results, weight has important impact on osmoregulation ability in same age fishes. Fries with higher weight can resist salinity stress after migration to Caspian Sea through production of more chloride cells and change in their position but those which remain in freshwater for a long time, would adapt easily to the new environment.

*Corresponding author