

مکان‌یابی آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase و سلولهای کلراید آبششی به روش ایمونوهیستوشیمی در بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

زهرا خوشنود؛ صابر خداینده* و سعیده مسافر خورجستان

Surp78@yahoo.com

دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ۳۵۶-۱۴۱۱۵

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۷

چکیده

تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) از گونه‌های بسیار ارزشمند اکوسیستم دریای خزر محسوب می‌گردد. به منظور مکان‌یابی سلولهای کلراید، ماهیها به مدت هفت روز با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند. بافت‌شناسی آبشش با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-فوشین و ایمونولوکالیزه نمودن آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase با استفاده از آنتی‌کور IgG_۵ صورت گرفت. برای اندازه‌گیری ابعاد سلولهای کلراید از نرم‌افزار Image Tools استفاده شد. سلولهای کلراید آبششی در بافت آبششی بر روی کمان آبششی، سپتوم بین برانشی، فیلامنت و لاملاها مشاهده شدند. هیچگونه سلول کلرایدی بر روی آبشش اپرکولی و نیز آبشش اسپیراکلی مشاهده نگردید. سلولها کروی تا تخم‌مرغی شکل بوده و ویژگی ایمونوفلورسنت را بیشتر در غشای قاعده‌ای - جانبی خود نشان دادند. نتایج شمارش مشخص نمود که در هر میلیمترمربع از بافت آبششی، ۲۸۹ سلول کلراید وجود دارد. بیشترین تعداد سلولهای کلراید بترتیب بر روی فیلامنت، بر روی لاملا، در پایه لاملاها و در فضای بین پایه لاملاها مشاهده شد و تعداد سلولها در تمامی این موقعیت‌ها دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود ($P < 0/01$). بچه ماهی تاسماهی ایرانی ۲ تا ۳ گرمی دارای سلولهای کلراید آبششی بوده و این سلولها از لحاظ بیان ژن و فعالیت آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase دارای اهمیت خاصی می‌باشند. سلولهای کلراید در قسمتهای مختلف آبشش ماهیان ۲ تا ۳ گرمی تاسماهی ایرانی وجود داشتند و به دلیل داشتن ناقلین سلولی فراوان از جمله Na^+ , K^+ -ATPase مکان مناسبی برای تبادلات یونی میان موجود و محیط بشمار می‌روند. حضور این سلولها به همراه مقادیر قابل توجهی از آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase می‌تواند نشانگر توان تنظیم اسمزی و روبرو شدن با تغییرات شوری محیط در این ماهی باشد.

کلمات کلیدی: تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus*، Na^+ , K^+ -ATPase، سلولهای کلراید

مقدمه

آبشش مهمترین اندامی است که عملکرد تنظیم اسمزی را بر عهده دارد و در اپی‌تلیوم آبششی، سلولهای کلراید که دارای دانسیته بالایی از آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ هستند مهمترین نقش را در روند تنظیم یونی و اسمزی بر عهده دارند. آبشش مهمترین جایگاه تبادل یونهای تک‌ظرفیتی بین بدن و محیط بشمار می‌رود (Evans, 1993). اپی‌تلیوم آبششی دارای چندین نوع سلول است که شامل سلولهای موکوسی، سلولهای کلراید و سلولهای سنگفرشی می‌باشند که در تمام این سلولها ژن $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ بیان می‌شود، اما در این میان دانسیته این آنزیم در سلولهای کلراید از همه این سلولها بیشتر بوده و به رقمی در حدود 10^8 آنزیم به ازای هر سلول می‌رسد، به همین سبب مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی زیرواحدهای آنزیم از روش‌های مطمئن به منظور مکان‌یابی سلولهای کلراید آبششی محسوب می‌گردد (Seidelin *et al.*, 1999). 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). سازگاری ماهی به شوری نیازمند ایجاد تغییرات عمده‌ای در وضعیت مورفولوژیک و فیزیولوژیک آبشش دارد. افزایش تعداد و اندازه و نیز تغییر در پراکنش سلولهای کلراید برخی از تغییرات عمده بافتی هستند که طی این سازگاری رخ می‌دهند. تغییر در میزان و نوع ناقلین سلولی و نیز تغییر در میزان فعالیت این ناقلین نیز از دیگر تغییرات سازشی در آبشش جهت مواجهه با محیط شور بشمار می‌روند (Evans *et al.*, 2005). اگرچه با روش بافت‌شناسی می‌توان تا حدودی سلولهای کلراید را مکان‌یابی و تغییرات آنها را مطالعه کرد، استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی دقت عمل را بالا برده و حضور قابل توجه آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ می‌تواند شاخصی برای آمادگی موجود برای مواجهه شدن با شوری‌های مختلف باشد. لذا استفاده از مکان‌یابی سلولهای کلراید با استفاده از ایمونوهیستوشیمی یکی از مطمئن‌ترین روشها بحساب می‌آید (Khodabandeh, 2006; Pelis *et al.*, 2001).

هر ساله تعداد زیادی از بچه ماهیان تکثیر شده در کارگاههای تکثیر استان‌های گیلان، مازندران و گرگان به این دریا رهاسازی می‌شوند. شناخت فیزیولوژی تنظیم اسمزی تاسماهیان، بدلیل ویژگی مهاجرت بین آبهای لب شور و شیرین از اهم مطالعات انجام شده بر روی این ماهی بشمار می‌رود که در

این میان شناخت مکان و پراکنش سلولهای کلراید، بعنوان اصلی‌ترین فاکتورهای تنظیم اسمزی، دارای اهمیت خاصی است.

مواد و روش کار

بچه ماهیان ۲ تا ۳ گرمی تاسماهی ایرانی در تیرماه سال ۱۳۸۵ از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت تهیه شدند و به آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور منتقل و به مدت ۷ روز در شرایط آزمایشگاه در آب شیرین نگهداری شدند. در تمام طول دوره سازگاری بچه ماهیان، دمای آب (۲۵ تا ۲۶ درجه سانتیگراد)، اکسیژن محلول (۶ تا ۷ میلی‌گرم در لیتر) و pH (در محدوده ۷ تا ۸) بصورت روزانه، توسط دستگاه Multiline P4 مورد کنترل و اندازه‌گیری قرار گرفت. تعدادی از بچه ماهیان جهت مطالعات بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی در محلول فیکساتیو بوئن به مدت ۲۴ ساعت تثبیت شدند. نمونه‌ها ۴ تا ۵ مرتبه با الکل اتانول ۷۰ درصد مورد شستشو قرار گرفتند و سپس توسط الکل اتانول ۹۵ و ۱۰۰ و در نهایت توسط الکل بوتانول آگیری شدند. نمونه‌ها پس از قرارگیری به مدت ۳ ساعت در گزین به منظور پارافینه‌کردن، در داخل آون در پارافین مایع قرار داده و پس از آن توسط پاراپلاست (Merck) قالب‌گیری شدند. از بافت‌ها برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر توسط میکروتوم (ساخت شرکت دید سبز) تهیه شد و بر روی لامهای معمولی قرار گرفتند. لامها پس از نگهداری در داخل آون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و پس از آن پارافین‌زدایی توسط گزین به روش هاتوکسیلین-فوشین رنگ‌آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری Micros مورد مطالعه و عکسبرداری قرار گرفتند (Mortoja & Mortoja-Pierson, 1967). به منظور مطالعات ایمونوهیستوشیمی، مشابه روش کار بافت‌شناسی از بافت‌ها برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه شد و برشها بر روی لامهای تیمار شده با محلول پلی-ال-لیزین قرار گرفتند. سپس لامها توسط گزین پارافین‌زدایی شده و پس از آن توسط سری افزایشی الکل اتانول (۵۰، ۷۰، ۹۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) آگیری شدند. پس از آن در محلول (Phosphate Buffer Saline) PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول PBS+NaCl+Tween20 و ۲۰ دقیقه نیز در محلول PBS+Regiler قرار گرفتند و پس از آن دو مرتبه

ANOVA و در نهایت جهت تعیین اختلاف میان تک‌تک داده‌ها از آزمون Dunnett t3 استفاده شد. کلیه آزمون‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 11.5 انجام گرفت.

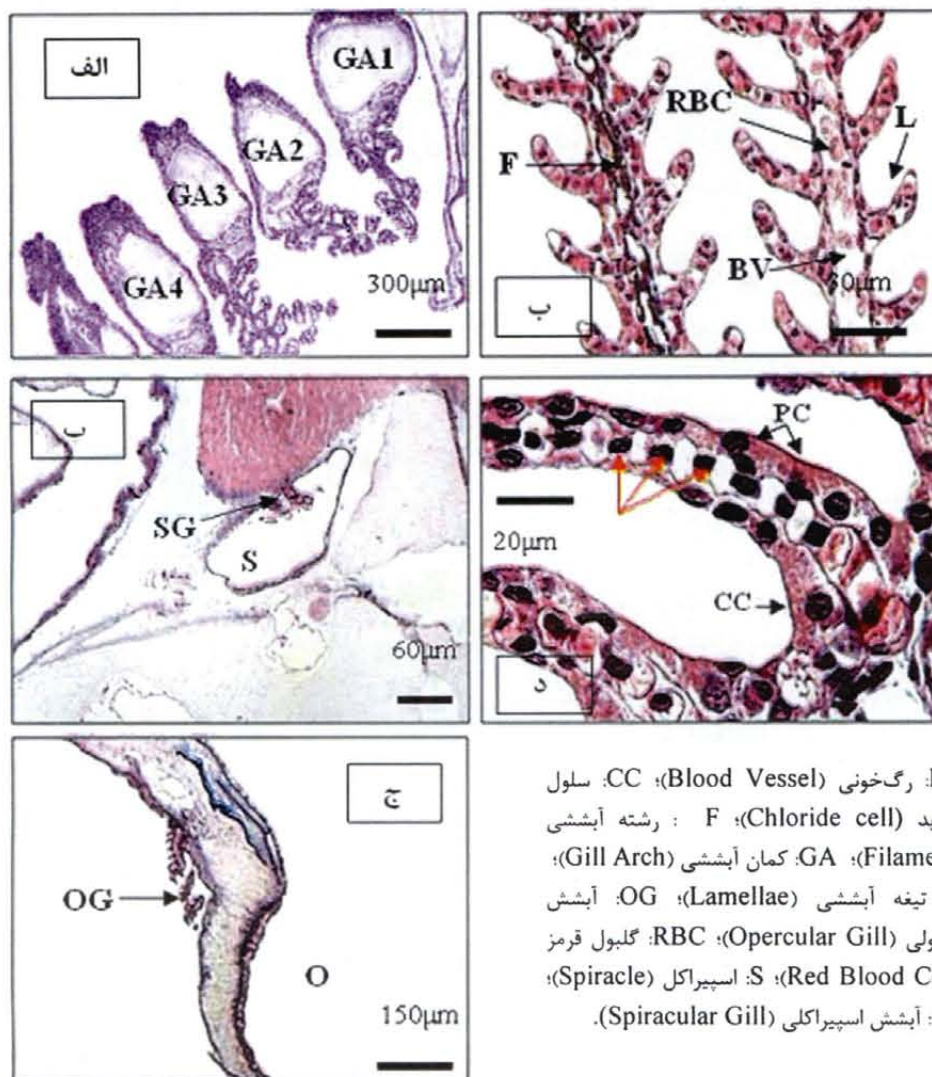
نتایج

نتایج مطالعات نشان داد که آبشش در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی از چهار جفت کمان آبششی در هر طرف سر تشکیل شده است (شکل ۱ الف). هر کدام از این کمان‌ها حامل دو ردیف از رشته‌های آبششی یا فیلامنت‌ها می‌باشد. بر روی دو طرف هر رشته آبششی نیز تیغه‌های آبششی یا لاملاها دیده می‌شوند (شکل ۱ ب). همچنین بچه ماهی تاسماهی ایرانی ۲ تا ۳ گرمی دارای آبشش اپرکولی و آبشش اسپیراکلی هستند (شکل ۱ پ و ۱ د). مطالعات بافت‌شناسی (شکل ۱ ج) و ایمونوهیستوشیمی (شکل ۱ ز) نشان داد که در بچه ماهیان ۲ تا ۳ گرمی تاسماهی ایرانی، سلول‌های کلراید در بخش‌های مختلف آبشش از جمله کمان آبششی، سیتوم بین برانشی، فیلامنت و نیز لاملاها پراکنش دارند. این سلول‌ها عموماً گروهی تا تخم‌مرغی شکل می‌باشد و ویژگی ایمونوفلورسنت عمدتاً در غشای قاعده‌ای-جانبی آنها دیده می‌شود (شکل ۲ ج). بر روی فیلامنت، این سلول‌ها همانطور که در نتایج مطالعات بافت‌شناسی دیده شد بیشتر در پایه لاملاها و نیز در فاصله بین پایه آنها دیده می‌شوند (شکل ۲ د). هیچگونه سلول ایمونوفلورسنتی در برانش اپرکولی و برانش اسپیراکلی دیده نشد. وجود ایمونوفلورسنت قوی در سلول‌های کلراید نشانگر حضور مقدار قابل ملاحظه‌ای از آنزیم Na^+ , K^+ ATPase در آنها می‌باشد (شکل ۲ ب و ۲ د).

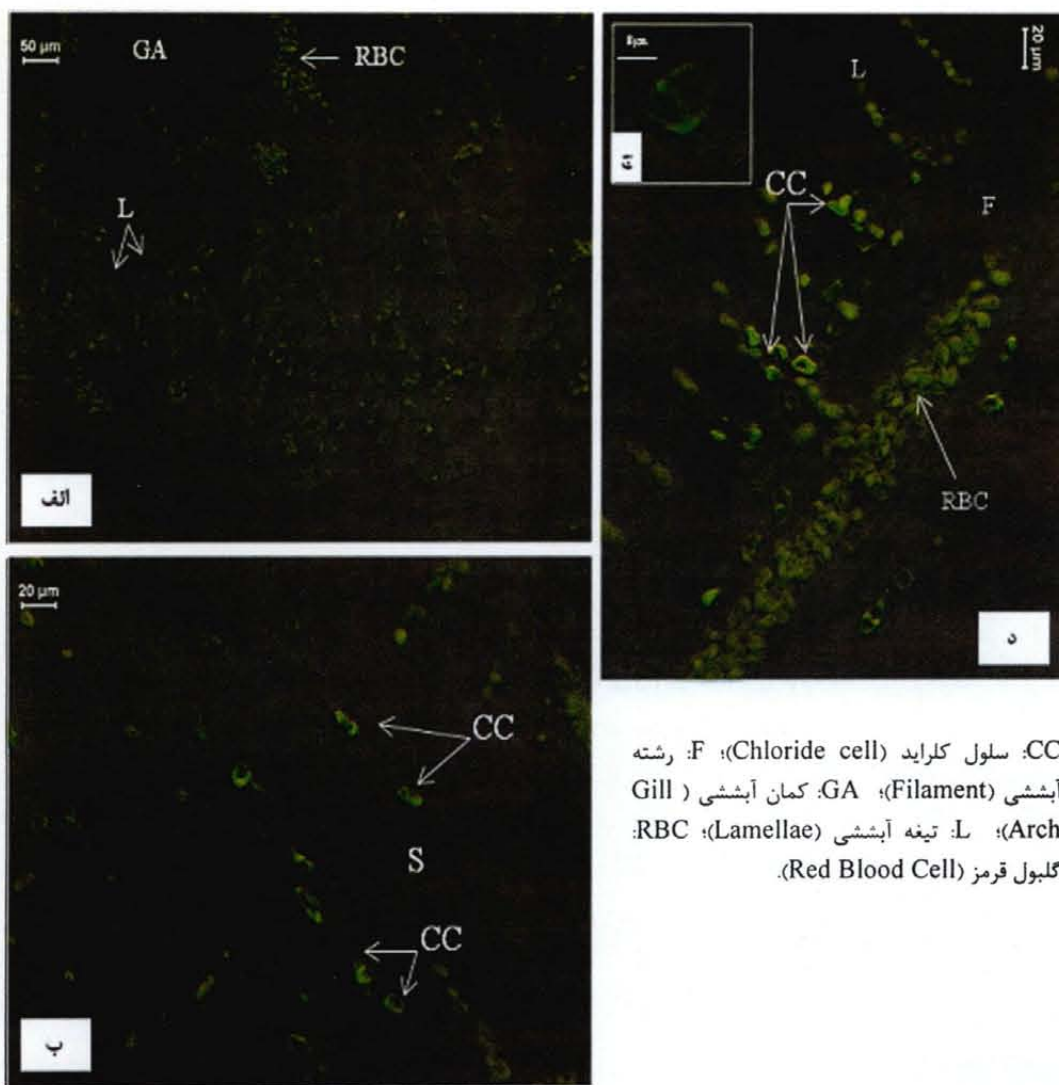
در شمارشی که از سلول‌های کلراید آبششی در این تیمار انجام شد، میانگین تعداد این سلول‌ها در هر چهار موقعیت (روی لاملا، پایه لاملا، بین لاملاها و در سایر بخش‌های فیلامنت) محاسبه و تعیین گردید. نتایج نشان داد که اختلاف میان این میانگین‌ها معنی‌دار می‌باشد (نمودار ۱). همچنین نتایج شمارش در این بخش نشان داد که در آبشش بچه ماهی ۲ تا ۳ گرمی تاسماهی ایرانی در هر میلی‌متر مربع از سطح بافت حدوداً ۲۸۹ سلول کلراید وجود دارد.

همچنین بر طبق اندازه‌گیری‌های بعمل آمده از سلول‌های کلراید در این بچه ماهیان، این سلول‌ها دارای میانگین طولی برابر با $16/0925 \pm 0/5$ میکرومتر و میانگین عرضی معادل $7/922 \pm 0/4$ میکرومتر بودند.

هربار به مدت ۳ دقیقه در محلول PBS شستشو داده شدند. سپس محلول آنتی‌کور I (Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) IgG α 5 رقیق شده با محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) بصورت ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌کور I به علاوه ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS+Regile (۱۰ برابر رقیق شده) برای ۱۰ لام (هر لام ۱۰۰ میکرولیتر) به لام‌ها اضافه گردید. لام‌ها در محفظه مرطوب به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از آن لام‌ها دو مرتبه هربار به مدت ۵ دقیقه توسط محلول PBS شستشو داده شدند. سپس محلول آنتی‌کور II، (FITC (Flourescin Isothiocyanate Conjugated) رقیق شده با محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) بصورت ۷ میکرولیتر آنتی‌کور II + ۹۹۳ میکرولیتر محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) برای ۱۰ لام، به هر لام ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. لام‌ها سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در محفظه مرطوب نگهداری شدند. پس از شستشوی لام‌ها در محلول PBS دو مرتبه و هربار به مدت ۵ دقیقه لام‌ها توسط (Sigma) Gel Mount Aqueous مونتاز شده و توسط میکروسکوپ نوری فلورسنت Olympus مورد مطالعه قرار گرفتند. در تعدادی از لام‌ها که بعنوان لام‌های شاهد انتخاب شدند به جای آنتی‌کور اول محلول ۱۰ برابر رقیق شده PBS+Regiler اضافه گردید. مکان‌یابی آنزیم Na^+ , K^+ ATPase با استفاده از آنتی‌کور IgG α 5 و براساس تکنیک Lignot و همکاران (2001) و Khodabandeh و همکاران (2006) صورت گرفت. شمارش سلول‌های کلراید با استفاده از تصاویر تهیه شده از مطالعات ایمونوهیستوشیمی صورت گرفت. سلول‌های کلراید در هر تیمار از ۷ ترانسکت تصادفی $290 \times 366/06$ میکرومتر بر روی برش طولی فیلامنت مورد شمارش قرار گرفتند (Pelis & McCormick, 2001). به منظور اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های کلراید در هر تیمار از ۷ ترانسکت تصادفی $290 \times 366/06$ میکرومتر بر روی برش طولی فیلامنت ۲۰ سلول بصورت تصادفی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند (Pelis & McCormick, 2001). در هر سلول بیشترین ارتفاع بعنوان طول و بیشترین پهنا بعنوان عرض در نظر گرفته شد. میانگین هر گروه محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت. کلیه اندازه‌گیری‌ها توسط نرم‌افزار Image Tools 2.0 انجام شد (Vaesamos, 2002). به منظور مقایسه مکان‌های حضور سلول‌های کلراید در بافت آبششی ابتدا از آزمون همگنی واریانس Leven و سپس به منظور تعیین اختلاف کلی بین میانگین‌ها از آزمون One-Way

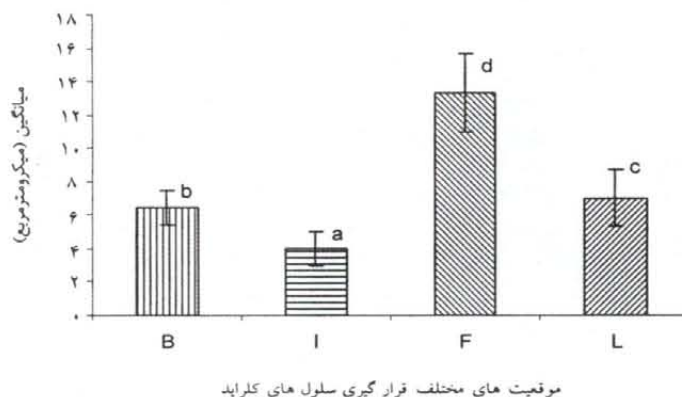


شکل ۱: بافت‌شناسی آبشش در بچه تاسماهی ایرانی (رنگ آمیزی با هما توکسیلین - فوشین). آبشش متشکل از چهار کمان آبششی در هر طرف سر (الف)؛ رشته‌های آبششی (فیلامنت) در دو سوی خود حاوی لاملاها (ب)؛ آبشش اسپیراکلی (پ)؛ آبشش اپرکولی (د)؛ سلولهای کلراید در پایه لاملا (ج).



شکل ۲: مکان‌یابی Na^+ , K^+ -ATPase به روش ایمونوهیستوشیمی. کمان‌های آبششی حامل سلولهای کلراید (الف)؛ سلولهای کلراید بر روی فیلامنت، لاملا، پایه لاملا و بین لاملاها (ب)؛ ویژگی ایمونوفلورسنت در غشاهای قاعده‌ای- جانبی یک سلول کلراید (ج)؛ سلولهای کلراید بر روی سیتوم بین برانشی (د).

شکل ۲: مکان‌یابی Na^+ , K^+ -ATPase به روش ایمونوهیستوشیمی. کمان‌های آبششی حامل سلولهای کلراید (الف)؛ سلولهای کلراید بر روی فیلامنت، لاملا، پایه لاملا و بین لاملاها (ب)؛ ویژگی ایمونوفلورسنت در غشاهای قاعده‌ای- جانبی یک سلول کلراید (ج)؛ سلولهای کلراید بر روی سیتوم بین برانشی (د).



نمودار ۱: مقایسه میانگین حضور سلولهای کلراید در قسمت‌های مختلف بافت آبششی در بچه ماهیان سازگار به آب شیرین (تیمار شاهد) در ۷ ترانسکت تصادفی با ابعاد $290 \times 366/06$ میکرومتر؛ B: پایه لاملا، I: بین لاملاها، F: بر روی فیلامنت و L: بر روی لاملا؛ حروف غیریکسان نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

بحث

کلراید روی برانشهای اپرکولی و نقش تنظیم یونی آنها اشاره شده است (Hirose *et al.*, 2003). همچنین حضور سلولهای کلراید روی فیلامنت‌ها، پایه لاملاها و بین لاملاها در ماهیان مختلف گزارش شده است (Altinok *et al.*, 1998; Pelis & McCormick, 2001; Evans *et al.*, 2005).

در تاسماهی ایرانی ۲ تا ۳ گرمی، سلولهای کلراید روی لاملاها نیز دیده شدند. حضور این سلولها در روی لاملاهای برخی ماهیان آب شیرین (Evans *et al.*, 2005) و عدم حضور آنها در برخی دیگر (Lin *et al.*, 2003؛ خدابنده و تقی زاده، ۱۳۸۵) قبلاً گزارش شده است و به نقش جذب یونی سلولهای کلراید لاملائی در آبهای با کمبود یون مربوط می‌گردد (Pelis & McCormick, 2001). به نظر می‌رسد در تاسماهی ایرانی نیز این سلولها در آب شیرین در جهت جذب یون‌ها فعالیت نمایند.

نتایج ایمونوهیستوشیمی نشان داد که بیشتر ایمونوفلورسنت در بخش قاعده‌ای- جانبی سلولهای کلراید دیده می‌شود و این با نقش جذب فعال این سلولها با استفاده از آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase مطابقت دارد. نتایج مطالعات انجام شده روی سایر گونه‌ها به روش ایمونوهیستوشیمی و ایمونوگلد نیز به حضور این

مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان داد که در بچه ماهیان ۲ تا ۳ گرمی تاسماهی ایرانی سازگار با آب شیرین سلولهای کلراید در بخش‌های مختلف آبشش از جمله کمان آبششی، سپتوم بین برانشی، فیلامنت و نیز لاملاها پراکنش دارند. هیچگونه سلول ایمونوفلورسنتی در برانش اپرکولی و برانش اسپیراکلی دیده نشد. به رغم انجام برخی مطالعات روی آبشش تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی، حضور سلولهای کلراید روی کمانها و سپتوم این ماهیان گزارش نشده بود و ساختار برانش‌های اپرکولی و اسپیراکلی نیز مورد توجه قرار نگرفته بود (Dettlaff *et al.*, 1992). وجود برانش‌های اپرکولی و اسپیراکلی در ماهیان جنس تاسماهی قبلاً گزارش شده بود (Harder, 1975) و با وجود عدم شناخت کامل ساختار و مکانیسمهای تنظیم اسمزی، مثل آنزیم-ها بیان شده بود که این آبشش‌ها ممکن است نقش تنفسی داشته و عملکرد تنظیم یونی نداشته باشند. در تحقیق حاضر استفاده از آنتی کور نشان داد که آبشش‌های اپرکولی و اسپیراکلی بچه تاسماهی سلولهای ایمونوفلورسنت به آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase را ندارند و نظریه عدم دخالت آبشش‌های مذکور در تنظیم اسمزی را تأیید می‌کند. در برخی از ماهیان استخوانی به حضور سلولهای

مانند بسیاری از گونه‌های ماهیان سلولهای کلراید آبششی در بچه ماهی ۲ تا ۳ گرمی تاسماهی ایرانی نیز وجود دارد و نشاندهنده نقش فعال سلولهای کلراید آبششی در این بچه - ماهیان می‌باشد، بدین مفهوم که در بچه ماهی ۲ تا ۳ گرمی ساختار بافت آبششی در حد بیان ژنهای ناقلین سلولی دخیل در تنظیم اسمزی (از جمله Na^+ , K^+ -ATPase) و نیز فعالیت‌های تنظیم یونی و اسمزی سلولهای کلراید تکامل یافته است. سلولهای کلراید بچه تاسماهی ایرانی در اوزان ۲ تا ۳ گرمی دارای دانسیته بالایی از آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase هستند و این آنزیم را می‌توان با استفاده از آنتی‌کور IgG α s مورد مکان‌یابی قرار داد. این امر همچنین نشاندهنده نقش مهم این سلولها در تبادلات یونی بین بافت آبششی و محیط پیرامونی می‌باشد.

منابع

- خدابنده، ص. و تقی‌زاده، ز.، ۱۳۸۵. مکان‌یابی آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase و سلولهای یونوسیت در آبشش گربه ماهی (*Silurus glanis*) به روش ایمونوهیستوشیمی. فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۱، صفحات ۴۵ تا ۵۲.
- Altinok, I. ; Galli S.M. and Chapman, F.A. , 1998. Ionic and osmotic regulation capabilities of juvenile Gulf of Mexico sturgeon, *Acipenser oxyrinchus de sotoi*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Vol. 120, pp.609- 616.
- Carmona, R. ; Garcia-Gallego, M. ; Sanz, A. ; Domezain, A. and Ostos-Garrido, M.V. , 2004. Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: Ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. Journal of Fish Biology, Vol. 64, pp.553-566.
- Dettlaff, T.A. ; Ginsburg, A.S. and Schmalhausen, O.I. , 1992. Sturgeon fishes: Developmental biology and aquaculture. Springer-Verlag. Germany, 300P.
- Evans, D.H. , 1993. The physiology of fishes. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp.157-176.

آنزیم در بخش قاعده‌ای- جانبی سلولهای کلراید اشاره دارد (Pelis & McCormick, 2001; Seidelin et al., 1999; Hirose et al., 2003; Evans et al., 2005).

نتایج شمارش سلولهای کلراید در آبشش بچه ماهیان تاسماهی ایرانی سازگار با آب شیرین نشان داد که در هر میلیمترمربع از سطح این بافت حدوداً ۲۸۹ سلول کلراید وجود دارد که بیشترین تعداد آنها بر روی فیلامنت و پس از آن بترتیب بر روی لاملاها، در پایه لاملاها و در فضای بین لاملایی وجود دارند. براساس مطالعات انجام شده در هر میلیمترمربع از بافت آبشش مارماهی ژاپنی ۵۰۰ گرمی (*Anguilla japonica*)، ۱۰۰۶ سلول کلراید (Wong & Chan, 2001)، در آبشش باس دریایی ۲۴۰ گرمی (*Dicentrarchus labrax*)، ۶۲۵۰ سلول کلراید (Varsamos, 2002)، در آبشش تیلایپای موزامبیک ۶۵ گرمی (*Oreochromis mossambicus*)، ۶۲۳۳ سلول کلراید (Van der Heijden et al., 1997)، در آبشش خامه ماهی ۳۱ گرمی (*Chanos chanos*)، ۴۰۰ سلول کلراید (Lin et al., 2003) و در آبشش سالمون آتلانتیک ۲۵ گرمی (*Salmo salar*)، ۱۲۰ سلول کلراید شمارش گردید (Pelis & McCormick, 2001). بنابراین به نظر می‌رسد که تعداد سلولهای کلراید در بافت آبششی در گونه‌ها و با اندازه‌های مختلف ماهیان با توجه به میزان فعالیت‌های فیزیولوژیک در سنین و اوزان مختلف متفاوت می‌باشد.

اندازه‌گیری ابعاد سلولهای کلراید در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی (۲ تا ۳ گرمی) نشان داد که میانگین طول در این سلولها برابر با $16/0935 \pm 0/5$ میکرومتر و میانگین عرض این سلولها برابر با $7/922 \pm 0/4$ میکرومتر می‌باشد. Carmona و همکارانش در سال ۲۰۰۴ ابعاد سلولهای کلراید را در آبشش استورژن آدریاتیک *Acipenser naccarii* بصورت طولی برابر ۱۸ میکرومتر و عرضی معادل ۱۲ میکرومتر محاسبه کردند.

از بررسی مطالعات سایر محققین و مقایسه نتایج تحقیق حاضر با آنها چنین بر می‌آید که همانند تعداد سلولهای کلراید، اندازه آنها نیز یک فاکتور وابسته به گونه بوده و در گونه‌های مختلف متفاوت است. اندازه نسبتاً بزرگ سلولهای کلراید در بچه تاسماهی ایرانی آب شیرین به همراه حضور قابل ملاحظه آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase در آنها توانایی بالای این ماهیان در جذب فعال یونهای آب اطراف آبشش‌ها را نشان می‌دهد.

- 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. *Physiology Review*, Vol. 85, pp.97- 177.
- Harder, W.E. , 1975.** Anatomy of fishes. Schweizer bartsche verlagsbuchhandlung. pp.253-260.
- Hirose, S. ; Kaneko, T. ; Natio, N. and Takei, Y. , 2003.** Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*, Vol. 136, pp.593-620.
- Khodabandeh, S. ; Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. , 2006.** Immunolocalization of Na^+ , K^+ -ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and post-embryonic development of the lobster, *Homarus gammarus*. *Journal of Crustacean Biology*, Vol. 26, No. 4, pp.515-523.
- Khodabandeh, S. , 2006.** Na^+ , K^+ -ATPase in the gut of the zygoptera *Ischnura elegans*, and anisoptera, *Libellula lydia* larvae (odonta): Activity and immunocytochemical localization. *Zoology Studies*, Vol. 45, pp.53-63.
- Lignot, J.H. ; Nugroho Susanto, G. ; Charmantier-Daures, M. and Charmantier, G. , 2001.** Immunolocalization of Na^+ , K^+ -ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell and Tissue Researches*, Vol. 319, pp.331-339.
- Lin, Y.M. ; Chen, C.N. and Lee, T.H. , 2003.** The expression of gill Na^+ , K^+ -ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackishwater and freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiologie, Part A*, Vol.135, pp.489- 497.
- Mortoja, R. and Mortoja-Pierson, M. , 1967.** Initiation aux techniques de l histology animal. Masson et Cie, Paris, France. 345P.
- Pelis, M.R. and McCormick, S.D. , 2001.** Effects of growth hormone and cortisol on Na-K-2Cl co transporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *General Comparative Endocrinology*, Vol.124, pp.134-143.
- Pelis, R.M. ; Zydlewski, J. and McCormick, S.D. , 2001.** Gill Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter abundance and location in Atlantic salmon: Effects of seawater and smolting. *American Journal of Physiology*, Vol. 280, pp.R1844-R1852.
- Seidelin, M. ; Madsen, S.S. ; Bryjalsen, A. and Kristiansen, K. , 1999.** Effects of insulin-like growth factor-I and cortisol on Na^+ , K^+ -ATPase expression in osmoregulatory tissues of Brown trout, *Salmo trutta*. *General Comparative Endocrinology*, Vol. 113, pp.331-342.
- Van der Heijden, A.J.H. ; Verboost, 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 seawater: Quantification by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 200, pp.55-64.
- Varsamos, S. , 2002.** Tolerance range and osmoregulation in hypersaline conditions in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Marine Biology*, UK. Vol. 82, pp.1047-1048.
- Wong, C.K. and Chan, D.K. , 2001.** Effects of cortisol on chloride cells in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Endocrinology*, Vol.168, pp.185-192.

Wood, C.M. and Marshall, W.S. , 1994. Ion balance, acid-base regulation, and chloride cell function in the common killifish, *Fundulus*

heteroclitus, a euryhaline estuarine teleosts. *Estuaries*, Vol. 17, pp.34-52.

Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase enzyme and gill chloride cells in fries of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*

Khoshnood Z. ; Khodabandeh S.* and Mosafer Khorjestan S.

Surp78@yahoo.com

Department of Natural Resources and Marine Science, International Campus, Tarbiat Modares University, P.O.Box: 14115-356 Noor, Iran

Received: February 2008

Accepted: September 2008

Keywords: *Acipenser persicus*, Na⁺, K⁺-ATPase, IgGα5, Chloride cells

Abstract

Persian sturgeon, *Acipenser persicus* is a valuable species in the Caspian Sea ecosystem. For gill chloride cells localization, fish specimens 2-3g were adapted to experimental conditions for 7 days. Gill histology was observed through light microscopy using Hematoxylin-Fushin staining. Immunolocalization of gill Na⁺, K⁺-ATPase was observed through fluorescent microscopy using mouse monoclonal antibody (IgGα5) rinsed against Na⁺, K⁺-ATPase α-subunit. Chloride cells dimensions was observed using Image Tools software. Gill chloride cells that have high density of Na⁺, K⁺-ATPase, were found on gill arch, gill septum, filament and lamellae. No chloride cells were observed on spiracular or opercular gills epithelium. Chloride cells were spherical to egg-shaped and showed immune-fluorescent activity on their baso-lateral sides. Results showed that in each square millimeter of gill epithelia, 289 chloride cells existed and the maximum number of these cells was found on filament, lamellae, base of the lamellae and on the inter-lamellar space. We also found that the number of these cells is significantly different in all branchial states. Persian sturgeon fry weighing 2-3g have gill chloride cells where Na⁺, K⁺-ATPase gene and their activity occurred. Because of their cellular transporters (like Na⁺, K⁺-ATPase), these cells were the main sites of the ionic and osmotic regulation between the fish and the environment.

* Corresponding author