

ایمونوهیستوشیمی سلول‌های کلراید آبشش ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) طی سازش با شوری‌های مختلف محیطی

هاجر پایی عبدالعلی موحدی نیا* رحیم عبدی

گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر- ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ آذر ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۵ اسفند ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: تنظیم میزان الکتروولیت‌ها و آب در آبزیان به دلیل وجود سطح تراوای وسیع که با محیط در تماس می‌باشند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این رو جهت تنظیم اسمزی و حفظ هومئوستاز مایعات بدن سازش‌ها و مکانیسم‌های متنوعی در سطوح مختلف زیستی توسعه پیدا کرده است. **هدف:** هدف از مطالعه حاضر تعیین تغییرات و سازش سلول‌های غنی از میتو کندری به عنوان یک سلول بسیار مهم پاسخ دهنده به این تغییرات تحت تأثیر شوری‌های مختلف محیطی در ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) که از گونه‌های بسیار مهم و اقتصادی در منطقه جنوبی کشور می‌باشد بوده است. **روش کار:** برای این منظور تعداد ۱۸۰ قطعه بچه ماهی صبیتی ۳ ماهه در محدوده وزنی ۱۵۰g و طول حدود ۲۵-۲۰cm به مدت یک هفته در تیمار با شوری‌های (۵، ۲۰، ۴۰ و ۶۰) که بر اساس مطالعات سایر محققین انتخاب شده بودند قرار داده شدند. مکان یابی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{--} \text{ATPase}$ در بافت پوششی آبشش در سلول‌های غنی از میتو کندری آبشش در شوری‌های مختلف محیطی طی روند سازش به روش ایمونوهیستوشیمیایی با استفاده از آنتی بادی IgG₅ انجام گرفت. **نتایج:** مکان یابی NKA نشان داد که سلول‌های غنی از میتو کندری به تعداد زیاد در اپیتلیوم فیلامنتی و به ندرت در اپیتلیوم لاملایی قرار دارند. شدت واکنش پذیری اپیتلیوم آبشش نسبت به آنتی بادی به کار رفته در طول دوره و در تیمارهای ۵ ppt و ۶۰ ppt روند افزایشی ولی در تیمار ۲۰ ppt روند نزولی را نشان داد. **نتیجه‌گیری نهایی:** بطور کلی، قدرت تحمل و سازش پذیری ماهی صبیتی نسبت به تغییرات شوری محیطی، بدلیل ایجاد تغییرات سریع در سلول‌های غنی از میتو کندری جهت تنظیم میزان ورود و خروج آب و الکتروولیت‌ها می‌باشد. به این صورت که در شرایط جدید ایجاد شده جهت تطابق سلول، تغییراتی در سطح دهانه‌های رأسی صورت می‌گیرد که میزان آنزیم‌های ناقل الکتروولیت‌ها در غشای پایه‌ای - جانبی را تنظیم و همچنین فعالیت میتو کندری‌های سلول‌های غنی از میتو کندری را با شرایط جدید تطبیق می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اکوفیز یولوژی، ایمونوهیستوشیمی، مکان یابی، سلول غنی از میتو کندری

مقدمه

کلراید یا سلول‌های یونوسیت که به سلول‌های غنی از میتو کندری نیز معروف می‌باشند از سلول‌های بسیار مهم در تنظیم اسمزی می‌باشند. میزان این سلول‌ها در ماهیان دریا زیاده‌دارای شبکه آندوپلاسمی خشن و سیستم توبولی توسعه یافته می‌باشند (۱). این سلول‌ها جهت تأمین انرژی برای انتقال یون، در چین خوردگی‌های غشاء قاعده‌ای - جانبی دارای آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{--} \text{ATPase}$ می‌باشند (۳). سطح رأسی سلول‌های غنی از میتو کندری بسیار انعطاف پذیر و دارای یک فرورفتگی می‌باشد (۱۶، ۲۰). یکی از ابزارهای مهم در تشخیص سلول‌های غنی از میتو کندری آب شور از انواع آب شیرین تغییر شکل این فرورفتگی‌ها در محیط‌های مختلف است. این فرورفتگی‌ها در محیط آب شور عمیق‌تر و در محیط‌های دارای آب شیرین با غلظت متوسط یون‌ها، کم عمق و در مناطق حاوی آب‌های شیرین با غلظت یونی پایین بصورت ریزپرز می‌باشند (۲). تحقیقات اخیر توسط محققین روی گونه‌های مختلف آبزیان نشان داده است که روش استفاده از آنتی بادی برای مکان یابی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{--} \text{ATPase}$ و در واقع سلول‌های کلراید از موفق‌ترین روش‌هاست و میزان حضور، بیان ژن و میزان فعالیت این آنزیم در شرایط اسمزی و یونی مختلف تغییر می‌کند (۴، ۸). در مطالعه‌ای که با هدف بررسی میزان نسبی سطح

ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) از خانواده ی شانک ماهیان (*Sparidae*) از گونه‌ای مهم و تجاری خلیج فارس محسوب شده و همه گونه‌های این خانواده دریایی بوده و غالباً ساکن آب‌های گرم می‌باشند. این گونه بومی ساکن خلیج فارس و خورهای مرتبط بوده که تکثیر و پرورش موفق آن توسط محققین داخلی به خصوص مرکز تحقیقات شیلات استان خوزستان انجام شده و در حال پیگیری می‌باشد. این گونه با توجه به شرایط زیستی و قابلیت تحمل شرایط اسارت به عنوان مدل مناسبی برای شرایط بیولوژیک لازم در تنظیم اسمزی ماهیان یوری هالین دریایی انتخاب شده است. کسب اطلاعات پایه و توصیف ویژگی‌های زیست شناختی در شرایط طبیعی و سازش‌های فیزیولوژیک می‌تواند راهکارهای لازم و مفیدی جهت مدیریت منابع و استفاده در اجرای موفق پرورش این ماهی را ارائه نماید. این ماهیان در مقایسه با سایر ماهیان دریایی بدلیل نوع ساختار آبشش می‌توانند دامنه وسیعی از شوری‌های محیطی در دریا را تحمل کنند. در ساختار آبشش ماهیان استخوانی از جمله گونه مورد مطالعه حداقل دو نوع بافت پوششی عمومی وجود دارد که نوع اول رشته‌ها و بافت‌های حمایت کننده را می‌پوشاند (۹) و نوع دوم تیغه‌ها را پوشش می‌دهد (۱۳). سلول‌های



(Horiba U-10، ژاپن)، ترمومتر دیجیتال (Horiba U-10، ژاپن)، دستگاه قابل حمل سنجش pH مدل (Ebro.PHT-3140) و دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن مدل (TECPEL DO-1609) انجام می‌شد. غذادهی در دو نوبت صبح و بعد از ظهر انجام و جهت تعویض آب تانک‌ها به صورت روزانه و پس از اتمام تغذیه جهت جلوگیری از افزایش آمونیاک و متابولیت‌های دیگر انجام شد (۴). شوری‌های مورد آزمایش ۵ ppt، ۲۰، ۴۰ (تیمار شاهد) و ۶۰ ppt در نظر گرفته و برای هر شوری سه تانک تکرار در نظر گرفته شد. برای این منظور نمونه‌برداری از آبشش ماهیان در ۳ مرحله در روز ۱، روز ۲ و روز ۷ بصورت همزمان و ۱ ماهی از هر تیمار (۳ ماهی) از هر تیمار در هر بار انجام و در محلول بوئن فیکس شدند (۴). برای مطالعه ایمنو هیستوشیمی، لام‌ها بعد از آبیگری در الکل اتانول خالص، در محلول فسفات بافر سالیین (PBS) ۱۰٪ شستشو داده و سپس وارد محلول A که ترکیبی از PBS، کلراید سدیم و توین بوده و در مرحله بعد وارد محلول B که ترکیبی از PBS و Regiler تشکیل شده بود شدند. سپس روی هر لام ۱۰۰ μl از آنتی کور IgGα۵ رقیق شده در PBS اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس ۱۰۰ μl از آنتی کور FITC روی هر لام اضافه شد و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شدند. کلیه لام‌ها بعد از قرار دادن لام روی آنها در جعبه‌های مخصوص چیده شده و برای حفظ خواص فلئورسانسی در جای تاریک نگهداری شدند. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلئورسانس (Lambda-1 LeitzDiaplan Coupled to a Ploemopak Lamp, Japan) با فیلترهای ۴۵۰-۴۹۰ nm مشاهده و سلول‌های کلراید موجود در پنج میدان دید برای هر نمونه شمارش و نتیجه حاصل به صورت میانگین ± خطای استاندارد محاسبه گردید (۹). مقایسه میانگین تعداد سلول‌های کلراید، در شوری‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و پس از مون توکی توسط نرم افزار SPSS ۱۱/۵ انجام گردید. درجه معنی‌داری ($p < 0.05$) مورد پذیرش قرار گرفته و از آنها عکس برداری شد (۱۰، ۱۱، ۱۳). کلیه عملیات مربوط به ایمنو هیستوشیمی و تهیه عکس‌ها در دانشکده منابع طبیعی نور، دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسید.

نتایج

نتایج حاکی از آن بود که تیغه‌های آبششی (لاملاها) در دو سمت رشته به خوبی قابل رویت بوده و سلول‌های غنی از میتوکندری در ناحیه بین تیغه‌ای قرار داشته همچنین سلول‌های خونی و سلول‌های موکوسی نیز بخوبی و در تیمار شاهد با شوری ۴۰ ppt قابل تشخیص بوده اند (تصویر ۱-۱). پس از در معرض قرار دادن ماهی‌ها با شوری‌های مختلف و بررسی تغییرات شدت واکنش سلول‌های کلراید آبشش نسبت به آنتی بادی به کار رفته در طول دوره در هر دو محیط هایپوسموتیک و هایپرسموتیک تفاوت‌های قابل

اشغال شده توسط میتوکندری در اپیتلیوم آبشش و کلیه بادکنک ماهی (*Spherooides testudineus*) بعد از سازگاری با محیط ایزوسموتیک صورت گرفت مشخص شد که، ناحیه اشغال شده توسط میتوکندری‌ها در نمونه‌های سازگار شده با محیط ایزوسموتیک (۱۰٪) نسبت به نمونه‌های گروه کنترل (۳۰٪) افزایش معنی‌داری داشته است (۸). براساس مطالعه Chen و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی آبشش خامه‌ماهی (*Chanos Chanos*) سازگار شده با آب شیرین و آب دریا، یونوسیت‌ها روی اپی‌تلیوم آبشش در هر دو گروه فراوان بوده بطوریکه این سلول‌ها به ندرت روی اپی‌تلیوم لاملائی ماهیان سازگار با آب دریا مشاهده شد درحالیکه در ماهیان سازگار شده به آب شیرین عموماً یافت می‌شود (۲). Varsamos و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان داشتند، آنزیم $Na^+/K^+ATPase$ که در غشای تمامی سلول‌های جانوری وجود دارد و در غشای قاعده‌ای جانبی یونوسیت‌های آبشش بسیار زیاد می‌باشد (۱۹). با توجه به تکثیر و پرورش گونه مورد نظر توسط مرکز تحقیقات شیلات جنوب کشور و امکان پرورش آن در شوری‌های پایین‌تر از خلیج فارس که در این مورد تنظیم اسمزی جانور در محیط با شوری‌های متفاوت نقش مهمی را بر عهده دارد و از آنجاییکه سلول‌های کلراید موجود در اپی‌تلیوم آبشش جایگاه و نقش مهمی برای جذب و دفع یون در آب دریا و آب شیرین می‌باشند و مطالعات روی ماهیان نشان داده که چگونه سلول‌های کلراید در زمان مهاجرت ماهی در شوری‌های مختلف آب دریا و یا بالعکس تغییر می‌یابد. بدلیل اینکه اصلی‌ترین عامل موفقیت این جانداران تسلط بر محیط متفاوت دریاها یعنی قدرت تنظیم یونی و حفظ هموستاز بدن که این عامل یکی از مهمترین و جذاب‌ترین تحقیقات برای دانشمندان به شمار می‌رود و به خصوص آنکه مطالعه اخیر بر روی یکی از ماهی‌های بومی خلیج فارس که دارای ارزش، اهمیت غذایی و اقتصادی بسیار فراوان برای ساکنین مناطق ساحلی جنوب می‌باشد پژوهش اخیر بر روش ایمنو هیستوشیمی که بهترین روش جهت تشخیص این سلول‌ها نیز می‌باشد (۲) صورت پذیرفت تا پاسخگوی جنبه‌های بافتی، فیزیولوژیکی و تنظیم یونی و اسمزی ماهی مورد نظر در مراکز تحقیقاتی و پژوهشی باشد.

مواد و روش کار

برای انجام این پروژه ۱۸۰ قطعه ماهی صبیتی ۳ ماهه در محدوده وزنی ۱۵۰g و طول کل حدود ۲۵-۲۰cm در ایستگاه تحقیقاتی بندر امام خمینی (ره) استفاده شدند. ماهی‌ها به صورت تصادفی در ۴ تیمار و با ۳ تکرار برای هر تیمار در تانک‌های ۳۰۰l محتوی آب دریای فیلتر و ضد عفونی شده با اشعه ماورای بنفش به مدت یک هفته (۲۲) قرار داده شدند. شرایط محیطی شامل دما و نور در طول پروژه برای تمامی تانک‌ها یکنواخت بوده و در طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل شوری، دما، pH و اکسیژن محلول به ترتیب با استفاده از رفرکتومتر نوری

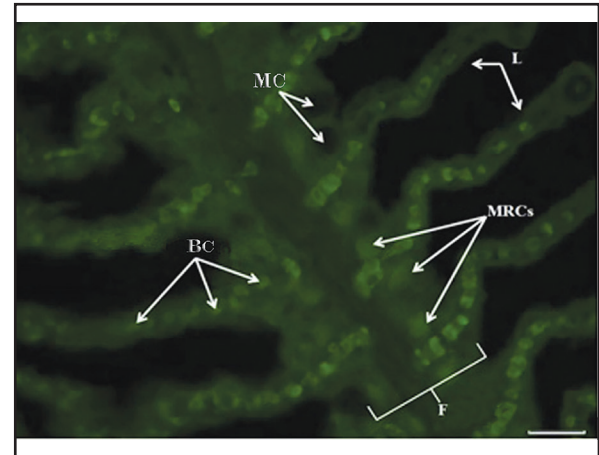


جدول ۱. Mean±sem مربوط به تعداد سلول‌های کلراید در مراحل مختلف نمونه برداری در شوری‌های متفاوت می‌باشد.

شوری نمونه برداری	۵ ppt	۲۰ ppt	۴۰ ppt	۶۰ ppt
روز ۱	۹/۴۹±۰/۶۴	۶/۳۶±۰/۶۱	۸/۲۲±۰/۸۷	۸/۹۱±۰/۳۳
روز ۲	۹/۴۱±۰/۳۵	۷/۴۵±۰/۴۱	۸/۷۳±۰/۲۸	۱۰/۱۱±۰/۵۸
روز ۷	۹/۹۲±۰/۱۲	۷/۱۱±۰/۶۰	۸/۶۱±۰/۱۳	۱۰/۲۷±۰/۳۱

بحث

استفاده از آنتی بادی IgGα5 جهت مکان یابی آنزیم Na^+, K^+ -ATPase و در واقع سلول‌های غنی از میتوکنندری در حشرات آبی، سخت پوستان و ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، باس دریایی، گویی، سالمون چام، خامه ماهی از موفق‌ترین روش ذکر گردیده است. براساس این تحقیقات، سلول‌های غنی از میتوکنندری اپیتلیوم لاملائی در پی انتقال ماهی از آب دریا به آب شیرین از تعداد آنها کاسته می‌شود (۵،۱۱). وارد کردن ماهی صبیتی به آب با شوری ۵ppt باعث ظاهر شدن سلول‌های غنی از میتوکنندری بر روی اپیتلیوم لاملاها گردیده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های غنی از میتوکنندری ماهی صبیتی در اپیتلیوم لاملائی در تنظیم اسمزی هیپوتونیک نقش دارند. چنین یافته‌ای را Varsamos و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعه مکان یابی سلول‌های غنی از میتوکنندری در باس دریایی (*Dicentrarchus Labrax*) آداپته شده به آب با شوری دو برابر آب دریا و آب شیرین نیز به دست آوردند. مطالعات انجام شده بر روی دو گونه *Trematomus bernacchii* و *Chionodraco hamatus* سلول‌های غنی از میتوکنندری لاملائی و فیلامنتی را بر روی بافت پوششی آبششی این گونه‌ها نشان داد (۶،۷). نتایج این محققین و نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر بر روی ماهی صبیتی بیان کننده این واقعیت می‌باشد که سلول‌های غنی از میتوکنندری بر اپیتلیوم لاملاها در محیط با شوری ۵ppt فعال می‌باشند و این مسئله، بر خلاف مطالعاتی می‌باشند که نقش سلول‌های غنی از میتوکنندری اپیتلیوم لاملاها را تنها در محیط‌های هیپرتونیک می‌دانند (۱۶). بررسی‌ها روی ماهیان مختلف بیانگر این است که سلول‌های غنی از میتوکنندری معمولاً روی لبه آوران رشته‌ها و در ناحیه بین تیغه‌های آبششی فراوان ترند و معمولاً روی بافت پوششی تیغه‌ها به مقدار کمتر یافت می‌شوند. هر چند که سازگاری گربه ماهی (*Hypostomus plecostomus*) به آب‌های شیرین سبب حضور سلول‌های غنی از میتوکنندری روی تیغه‌های آبششی جهت بهبود ظرفیت تنظیم یونی آبشش گردیده است (۱۸). آنزیم Na^+, K^+ -ATPase به میزان قابل ملاحظه‌ای در قسمت قاعده‌ای-جانبی سلول‌های غنی از میتوکنندری آبشش گربه ماهی اسبله حضور داشت. بنابراین حضور قابل ملاحظه این آنزیم را می‌توان بیان‌گر توانایی هیپواسمولاریتی در گربه ماهی در نظر گرفت. نتایج تحقیق روی ماهی گویی نشان داده است که در دوره سازگاری این ماهی به آب دریا و آب شیرین، نه تنها تعداد و اندازه سلول‌های غنی از میتوکنندری بلکه میزان حضور آنزیم Na^+, K^+ -ATPase در آبشش ماهی نیز برای عملکرد تنظیم یونی ضروری است. در ماهی‌های استنوهالین آب شیرین و در ماهی یوری هالین سازگاری داده شده به آب شیرین حضور سلول‌های غنی از میتوکنندری روی تیغه‌های آبششی نیز گزارش شده است (۱۷). در پژوهشی که توسط Khodabandeh و همکاران در سال ۲۰۰۹

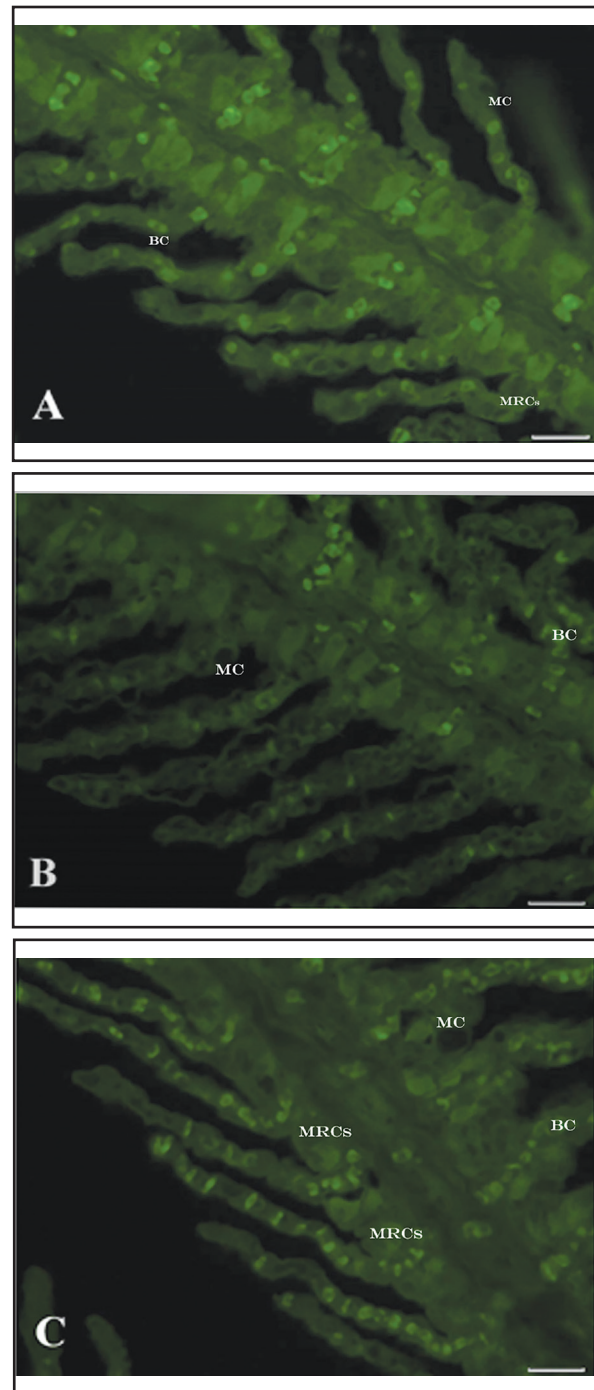


تصویر ۱. مکان یابی آنزیم Na^+, K^+ -ATPase در برش طولی رشته‌های آبششی ماهی صبیتی در شوری ۴۰ ppt. فیلامنت (F)، تیغه‌ها و لاملاهای آبششی (L) در دو سمت رشته به خوبی قابل رویت می‌باشند. سلول‌های غنی از میتوکنندری (MRCs) در ناحیه بین تیغه‌های قرار داشته سلول‌های خونی (BC) و موکوسی (MC) نیز قابل تشخیص می‌باشند. مقیاس ۴۰=۱μm.

ملاحظه‌ای مشاهده گردید بطوریکه بر اساس جدول ۱-۱ بیشترین تعداد این سلول‌ها در شوری ۶۰ ppt و در روز هفتم (۱۰/۲۷±۰/۳۱) و کمترین تعداد آن در شوری ۲۰ ppt و در روز اول (۶/۳۶±۰/۶۱) بوده است. اما در تمام شوری‌ها و در تمام روزهای نمونه‌برداری اختلاف تعداد سلول‌های کلراید از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است ($p < 0.05$). در شوری ۵ppt اندکی بعد از شروع دوره، شدت واکنش پذیری افزایش یافت. بطوری که در روز هفتم شدت واکنش پذیری اپیتلیوم فیلامنتی نسبت به روز اول و دوم افزایش بیشتری نشان داد (تصویر ۲-A). در هفته اول آزمایش، مکان یابی NKA نشان داد که سلول‌های غنی از میتوکنندری به تعداد زیاد در اپیتلیوم فیلامنتی و به ندرت در اپیتلیوم لاملائی در این شوری دیده شدند، که سلول‌های غنی از میتوکنندری معمولاً روی لبه آوران رشته‌ها در قسمت رأسی لاملا، پایه لاملا و بین لاملا حضور داشتند. در شوری ۲۰ ppt شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری نسبت به بقیه شوری‌ها کمتر شده بود. این کاهش شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری در این شوری محدود به اپیتلیوم فیلامنتی و به مقدار اندکی اپیتلیوم لاملائی بود (تصویر ۲-B). در شوری ۶۰ ppt نسبت به مابقی شوری‌ها، تغییرات صعودی بود به نحوی که بیشترین شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری در پایان دوره در این شوری بود. که این افزایش شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری در شوری ۶۰ ppt مربوط به اپیتلیوم فیلامنتی و لاملائی بود (تصویر ۲-C).



افزایش یافته که این واکنش پذیری در اپیتلیوم لاملاهی به مقدار کم مشاهده شد. تحقیق مشابهی توسط Zydlowski و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام پذیرفته و گزارش نمودند که شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری در اپیتلیوم لاملاهی ماهی شاد امریکایی (Alosasa pidissimas) سازگار شده با آب شیرین را خیلی بیشتر از همین ماهی در سازگاری با شوری ۳۱ ppt بود. همچنین در یک تحقیق نشان دادند که در پدل فیش (*Polydons pathula*) این سلول‌ها به طور کلی در ناحیه قاعده‌ای تیغه‌های آبششی و همچنین بین تیغه‌ها قرار گرفته اند (۴). در ماهی صبیتی در شوری ۶۰ ppt نسبت به سایر شوری‌ها، شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری بیشتر بود. این افزایش شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری در شوری ۶۰ ppt محدود به اپیتلیوم فیلامنتی بود. این چنین نتیجه‌ای را Ouattara و همکاران در سال ۲۰۰۹ با مطالعه مرفولوژی و وظایف سلول‌های غنی از میتوکنندری در تیلایپا بعد از انتقال به آب شیرین، شوری ۳۵ ppt، شوری ۷۰ ppt و شوری ۹۰ ppt مشاهده و گزارش کردند که سلول‌های غنی از میتوکنندری در آب شیرین فقط در پایه فیلامنت وجود داشته ولی در شوری‌های ۳۵ ppt، ۷۰ و ۹۰ این سلول‌ها در پایه فیلامنت‌ها و لاملاها پراکنده شده بودند (۱۵). در تحقیق حاضر نیز با افزایش شوری این سلول‌ها هم در پایه فیلامنت‌ها و هم در لاملاها بصورت پراکنده مشاهده گردیدند. همچنین مطالعه بر روی ماهی تیلایپای موزامبیک گزارش کردند که شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری موقع انتقال ماهی از آب شیرین به شوری‌های ۳۰ ppt و ۶۰ ppt افزایش می‌یابد (۲۲). Wilson و همکاران در سال ۲۰۰۲ چنین افزایشی را در ماهی آزاد کوهو بعد از انتقال به شوری ۶۰ ppt مشاهده کردند بطوریکه این افزایش شدت در شوری‌های بالاتر منطبق با افزایش در تعداد و فعالیت پمپ $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ می‌باشد (۲۱). اکثر ماهی‌ها پاسخ‌های مختلفی از فعالیت $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در گونه‌های دریایی نشان می‌دهند بطوریکه این سازگاری‌های معنی‌دار در *Grey Mullet Golden (Liza aurata)* و دیگر ماهی‌های دریایی به شوری کم محیطی می‌تواند پاسخ مهم از نمونه‌هایی که از آب شیرین به دریا مهاجرت می‌کنند باشد (۲۳). در شوری ۲۰ ppt شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری نسبت به بقیه شوری‌ها کمتر شده بود. این کاهش شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری در این شوری محدود به اپیتلیوم فیلامنتی بود. به طور مشابهی Fielder و همکاران در سال ۲۰۰۷ با پژوهش بر روی این سلول‌ها در قسمت فیلامنتی ماهی (*Pagrus auratus*) نشان دادند که شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکنندری در مواجهه با شوری ۲۰ ppt کاهش یافت که با نتایج Lee و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۴، ۴) مطابقت دارد. این محققین بر این باورند که به خاطر کاهش اختلاف در غلظت یون‌ها بین محیط خارجی و مایعات بدن ماهی، در محیط ۲۰ ppt، نیاز به دفع فعال یون‌های اضافی، کاهش



تصویر ۲. مکان یابی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در برش طولی رشته‌های آبششی ماهی صبیتی طی سازش با شوری‌های مختلف محیطی که شامل ۵ ppt (A)، ۲۰ ppt (B) و ۶۰ ppt (C). مقیاس = $40 \mu\text{m}$.

بروی ماهی *Grey Mullet Golden (Liza aurata)* با آب شیرین و شوری ۱۲ ppt، ۳۶ و ۴۶ انجام شد گزارش گردید که سلول‌های غنی از میتوکنندری روی اپیتلیوم فیلامنتی و روی لاملا مشاهده شده‌اند. در انتقال ماهی به شوری ۱۲ ppt شدت واکنش پذیری سلول‌های NKA در اپیتلیوم فیلامنت کاهش یافت و این سلول‌ها در اپیتلیوم لاملاها مشاهده نشدند. در شوری‌های ۳۶ ppt و ۴۶ شدت واکنش پذیری در اپیتلیوم فیلامنتی



References

1. Baldisserotto, B., Mancera, J.M., Kapoor, B.G. (2007) Fish Osmoregulation. Science Publishers, Enfield, USA.
2. Chen, C.N., Lin, L.Y., Lee, T.H. (2004) Ionocyte distribution in gills of the euryhaline milk fish, *Chanos chanos* (Forsskal, 1775). Zoological Studies. 43: 772-777.
3. 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. Physiological Review. 85: 97-177.
4. Fielder, D.S., Allan, G.L., Pepperall, D., Pankhurst, P.M. (2007) The effects of change in salinity on osmoregulation and chloride cell morphology of juvenile Australian snapper, *Pagrus auratus*. Aquaculture. 272: 656-666.
5. Giffard-Mena, I., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Castille, R. (2006) Digestive Tract Ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: Implication in Osmoregulation. Dev Growth Differ. 48: 139-151.
6. Gonzalez, R., Cooper, J., Head, J. (2006) Physiological responses to hyper-saline waters in sailfin mollies, *Poecilia latipinna*. Com Biochem physiol. 142: 397-403.
7. Guner, Y., Ozden, O., Cagirgan, H., Altunok, M., Kizak, V. (2005) Effect of salinity on the Osmoregulatory functions of the gills in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Turk Vet Anim Sci. 29: 1259-1266.
8. Hiroi, J., McCormick, S.D. (2007) Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids, *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. J Exp Biol. 210: 1015-1024.
9. Kaneko, T., Shiraishi, K., Katoh, F., Hasegawa, S., Hiroi, J. (2008) Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. Fish Sci. 68: 1-9.
10. Khodabandeh, S. (2006) Na⁺, K⁺-ATPase in the Gut of the Zygoptera, *Ischnura legans*, and Anisoptera, *Libellula lydia*, Larvae (Odonata): Ac-

می‌یابد. لذا در یک پاسخ سازشی، با کاهش تعداد و اندازه سلول‌های غنی از میتوکندری، تعداد آنزیم‌ها و ناقل‌های یونی که در غشای سلولی جای دارند و در نتیجه، فعالیت این سلول‌ها کمتر می‌شود.

نتیجه‌گیری: مطالعه اخیر حاکی از آن بود که قدرت سازش پذیری این گونه در مقابل تغییرات شوری محیط، بدلیل ایجاد تغییرات سریع در سلول‌های غنی از میتوکندری جهت تنظیم میزان ورود و خروج آب و الکترولیت‌ها می‌باشد. بطوری که در شرایط جدید جهت تطابق سلول، تغییراتی در قسمت دهانه‌های رأسی صورت می‌گیرد که میزان آنزیم‌های ناقل الکترولیت‌ها در غشای پایه‌ای - جانبی را تنظیم و همچنین فعالیت میتوکندری‌های سلول‌های غنی از میتوکندری را در شرایط جدید مطابقت دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه مدیریت و کارکنان محترم ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی واقع در بندر امام خمینی (ره) سپاسگزاری می‌نمایند.

tivity and Immunocytochemical Localization. Zool Studies. 45: 53-63.

11. Khodabandeh, S., Khoshnood, Z., Mosafer, S. (2009b) Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. Aquaculture Res. 40: 329-336.
12. Khodabandeh, S., Shahriarimoghaddm, 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. Cell J. 11: 49-54.
13. Khodabandeh, S., Shahriarimoghaddam, M., Abtahi, B. (2009a) 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 J. 11: 49-54.
14. Lee, K.M., Kaneko, T., Katoh, F., Aida, K. (2006) Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in *fugu* *Takifugu rubripes* exposed to a hypoosmotic environment. Gen Comp Endocrinol. 149: 285-293.
15. Ouattara, N., Bodinier, CH., Nègre-Sadargues,



- G., Dcotta, H., Messad, S., Charmantier, G., Panfili, J., Baroiller, J. (2009) Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. *Aquaculture*. 290: 155-164.
16. Platell, M.E., Ang, H.P., Hesp, S.A., Potter, I.C. (2007) Comparisons between the influences of habitat, body size and season on the dietary composition of the sparid *Acanthopagrus latus* in a large marine embayment. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 72: 626-634.
17. Saoud, I.P., Kreydiyyeh, S., Chalfoun, A., Fakih, M. (2007) Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rabbit fish, *Siganu srivulatus*. *J Exp Mari Biol Ecol*. 348: 183-190.
18. Tang, C.H., Wu, W.Y., Tsai, S.C., Yoshinaga, T., Lee, T.H. (2010) Elevated Na⁺, K⁺-ATPase responses and its potential role in triggering ion reabsorption in kidneys for homeostasis of marine euryhaline milk fish, *Chanos chanos* when acclimated to hypotonic fresh water. *J Comp Physiol Part B*. 180: 813 -824.
19. Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G. (2005) Ontogeny of osmoregulation in fish. *Comparative Biochem and Physiol*. 141: 401-429.
20. Wang, P., Lin, C., Hwang, L., Huang, C., Lee, T., Hwang, P. (2009) Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. *Comparative Biochem and Physiol*. 152: 544-551.
21. Wilson, J.M., Whiteley, N.M., Randal, D.J. (2002) Inoregulatory changes in gill epithelia of coho salmon during seawater acclimation. *Physio Biochem Zool*. 75: 237-240.
22. Wong, C.K.C., Chan, D.K.O. (1999) Chloride cell subtypes in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Am J Physiol Regul Integr Physiol*. 277: 517-522.
23. Wood, C.M., Marshall, W.S. (1994) Ion balance, acid-base regulation, and chloride cell function in the common killifish, *Fundulus heterochlitus*: a euryhaline estuarine teleost. *Estuaries*. 17: 34-52.
24. Zydlewski, J., McCormick, S.D. (2001) Developmental and environmental regulation of chloride cells in young American shad, *Alosa sapidissima*. *J Exp Zool*. 290: 73-87.



Immunohistochemical study on gill chloride cells in Sobaity, *Sparidentex hasta* under different environmental salinities

Papi, H., Movahedinia, A. *, Abdi, R.

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr- Iran

(Received 15 December 2015, Accepted 24 February 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Regulation of electrolytes levels and water in fish is very important because of its vast permeable surfaces that are in contact with the environment. Therefore, for homeostasis and osmoregulation, various adaptation mechanisms at different biological levels have been developed. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to determine the changes and adaptations of mitochondria-rich cells as an important cellular response to these changes. This was influenced by different environmental salinities in fish *Sparidentex hasta* which are very important economic species in the southern region of the country. **METHODS:** 180 fish, aged three months, 20 - 25 cm in length and weighing about 150 gr were exposed directly to different concentrations of salt (5, 20, 40 and 60 ppt) for 1 week. Localization of the Na⁺, K⁺-ATPase in mitochondria-rich cells in gill epithelial were studied in different environmental salinities during the adaptation period. was performed by using IgG α 5 as immunohistochemistry method. **RESULTS:** NKA localization showed that the mitochondria-rich cells are in the filament and rarely in lamellar epithelium. Intensity reactive of the antibody used during the period showed an increase in 5 and 60 ppt and decrease in 40 ppt. **CONCLUSIONS:** Generally, tolerance and compatibility of *Sparidentex hasta* to salinity changes are due to rapid changes in mitochondria-rich cells to regulate the entry and exit of water and electrolytes. So to adapt with the new condition of environment some changes in the apical openings appear that regulate the amount of the carrier electrolyte enzymes in basolateral membrane. It also causes adaption of mitochondria activity to the new condition.

Keyword: ecophysiology, immunohistochemistry, immunolocalization, mitochondria rich cell

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean \pm sem of number of chloride cells in different sampling times and salinities.

Figure 1. Localization of Na⁺, K⁺-ATPase in longitudinal section of gill filament of *Sparidentex hasta* in 40ppt salinity. Filament (F) and gill lamellae (L) were seen in both sides of filament. MRCs are located among filament also blood and mucous cells are visible clearly. Scale bar = 40 μ m.

Figure 2. Localization of Na⁺, K⁺-ATPase in longitudinal section of gill filament of *Sparidentex hasta* under different salinities including 5ppt (A), 20ppt (B) and 60ppt (C). Scale bar=40 μ m.



*Corresponding author's email: amovahedinia@yahoo.com, Tel: 0615-3533322, Fax: 0615-3533322

J. Vet. Res. 71, 2, 2016