مطالعه تغییرات هیستوفیزیولوژیک غده تیروئید گربه کوسه عربی *Chiloscyllium arabicum* خلیج‌فارس در دو فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی

حسنه مطوریان[۱]، نگین سلامات[۱*] و عبدالعلی موحدی نیا[۲]

[۱] خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، گروه زیست‌شناسی دریا

[۲] بابلسر، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه مازندران، گروه زیست‌شناسی دریا

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۰

چکیده

درتحقیق حاضر، ۵۰ قطعه گربه کوسه‌ماهی عربی (*Chiloscyllium arabicum*) در دو فصل تولیدمثلی (بهار) و غیرتولیدمثلی (پاییز) از آب‌های بندر بحرکان واقع در شمال خلیج‌فارس صید شد. نمونه خون از سیاهرگ دمی ماهیان اخذ و سپس پلاسما جداسازی شد. غلظت هورمون‌های T_3، T_4 و TSH به روش الایزا در پلاسمای خون این ماهیان اندازه‌گیری شد. همچنین، نمونه‌های بافتی از غده تیروئید ماهیان اخذ و به مایع ثبوت بوئن منتقل شد. جهت مطالعات بافت‌شناسی، از نمونه‌ها به روش معمول بافت‌شناسی قالب‌های پارافینه تهیه شد. سپس برش‌های میکروسکوپی به ضخامت ۶-۵ میکرومتر از قالب‌های پارافینه تهیه و مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین قرار گرفتند. براساس نتایج، غده تیروئید به‌صورت یک غده دارای کپسول، متراکم و تک لوبی مشاهده گردید. این غده متشکل از فولیکول‌های تیروئیدی کروی بود که توسط لایه‌ای از سلول‌های پوششی که شکل آنها باتوجه به میزان فعالیت غده تیروئید در دو فصل متفاوت بود، پوشیده شده بود. فولیکولها توسط مایع کلوئیدی ژلاتینی دارای واکوئل پرشده بودند. در فصل تولیدمثل، فولیکولهای تیروئیدی عمدتاً کوچک بوده و توسط لایه‌ای از سلول پوششی مکعبی بلند پوشیده شده بودند و تعداد زیادی واکوئل در مایع کلوئیدی مشاهده شد. در فصل غیرتولید مثلی فولیکولها عمدتاً، بزرگ بوده و دارای لایه‌ای از سلول‌های سنگفرشی و مایع کلوئیدی با تعداد کمی واکوئل بودند. از طرفی، غلظت هورمون‌های T_3، T_4 و TSH در فصل تولیدمثلی نسبت به فصل غیرتولیدمثلی افزایش معنی‌داری داشت. ارتفاع بافت پوششی فولیکولها و غلظت هورمون‌های تیروئیدی (میزان فعالیت تیروئید) در *C. arabicum* به‌طور معنی‌داری در طی فصل تولیدمثلی افزایش یافت. به نظر می‌رسد این تغییرات در غده تیروئید دارای ارتباط تنگاتنگی با تغییرات جنسی دراین ماهی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گربه کوسه عربی، غده تیروئید، تری یدوتیرونین، تیروکسین، هورمون محرک تیروئیدی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۱۶۵۱۴۶، پست الکترونیکی: salamatnegin@gmail.com

مقدمه

الاسموبرانش‌ها زیررده‌ای از ماهیان غضروفی بوده که حدود ۳۵۰ میلیون سال پیش به وجود آمده و شامل کوسه‌ها، اسکیت‌ها و سفره‌ماهیان می‌باشند (۱۲). اعضاء این زیررده دارای ویژگی‌های مشترکی از قبیل داشتن پنج‌تا هفت شکاف آبششی که هریک جداگانه به خارج باز می‌شوند، باله‌های پشتی سخت و فلس‌های پلاکوئید بر روی پوست می‌باشند (۱۲). این ماهیان دارای طیف گسترده‌ای از زیستگاه‌های دریایی و اقیانوسی یافته شده، ولی به دلیل داشتن رشد آهسته و بلوغ دیررس در معرض خطر و انقراض هستند (۱۳). گربه کوسه‌ماهی عربی (*Chillodcyllium arabicum*)، ازجمله کوسه‌ماهیان جنس Chiloscyllium و خانواده Hemiscyllidae بوده که بومی

سواحل اقیانوس آرام و هند هستند، ولی در سواحل و خوریات خلیج‌فارس نیز یافت شده و صید می‌گردند (۱۴). کوسه‌ماهی عربی دارای بدنی بلند، باریک و تقریباً استوانه‌ای و ضخیم و پوزه‌ای گرد می‌باشد. این کوسه ساکن آب‌های ساحلی عمیق بین ۳ تا۱۰۰ متر می‌باشد، هرچند بسیاری از آن‌ها در آب‌های کم‌عمق ۱۰ متری نیز دیده‌شده‌اند. این ماهیان در فصل بهار و تابستان به تعداد زیاد در خلیج‌فارس دیده می‌شوند (۱۰). این کوسه‌ها تخم‌گذار بوده و تخم در غلاف تخمی مدور قرار دارد (۱۰). کوسه‌ماهی عربی از بی‌مهرگان کف‌زی و احتمالاً ماهی‌های کوچک تغذیه می‌کنند، اما باوجود فراوانی آن‌ها، دامنه زیست‌شناسی این کوسه‌ها کمتر شناخته‌شده است (۱۰). کوسه‌ماهیان همانند سایر مهره‌داران دارای غدد درون‌ریز مانند غده تیروئید می‌باشند (۶).

غده تیروئید یکی از غدد درون‌ریز محسوب می‌شود که در سیر تکاملی موجودات، به‌خوبی حفظ‌شده و در تمام جانوران مهره‌دار، توصیف‌شده است (۷). بیوسنتز هورمون‌های تیروئیدی، تنظیم مرکزی فعالیت غده تیروئید، مسیرهای متابولیک محیطی هورمون‌های تیروئیدی و عملکرد تیروئید در ماهیان، دوزیستان، خزندگان، پرندگان و پستانداران بسیار مشابه یکدیگرند (۵). در تمام مهره‌داران غده تیروئید از رشد قسمت میانی–شکمی بافت پوششی حلقی در طول مرحله رویانی به وجود می‌آید (۱۵). برخلاف پستانداران، غده تیروئید در بسیاری از ماهی‌های استخوانی حقیقی اندام مستقلی نبوده و فولیکول‌های آن به شکل منفرد یا دسته‌ای در داخل بافت همبند در اطراف شاخه‌های شریان آوران آبششی پراکنده هستند (۱۶).

واحد ساختاری غده تیروئید در تمامی مهره‌داران شامل فولیکول‌هایی است که توسط یک سیستم عروقی پیچیده متشکل از مویرگ‌های خونی احاطه‌شده‌اند. هر فولیکول متشکل از سلول‌های پوششی احاطه‌کننده یک حفره مرکزی حاوی مایع کلوئیدی پروتئینی غنی از ید به نام تیروگلوبین (Thyroglobine) است که این پروتئین به‌وسیله سلول‌های فولیکولی حساس به هورمون محرک تیروئید (TSH= Thyroid Stimulating Hormone)، جذب‌شده و پیش‌ازاین که به خون ترشح شود از طریق هیدرولیز به هورمون تیروکسین (Thyroxine)(تترایدوتیرونین) T4)، تبدیل می‌شود. سپس درنتیجه مونودیدیناسیون T4 توسط ′۵– مونودیدیناز در اندام‌هایی مثل کبد و کلیه این هورمون به تری یدوتیرونین (T3) تبدیل می‌شود. T4 عمدتاً به‌عنوان پیش‌ساز T3 مطرح بوده، درحالیکه، T3 فرم فعال بیولوژیکی هورمون تیروئید است (۲۰).

عملکرد هورمون‌های تیروئیدی T4 و T3 در ماهیان مشابه عملکرد آن‌ها در پستانداران می‌باشد (۱۶). این هورمون‌ها بر کبد، قلب و سیستم عصبی اثر گذاشته، قلب و عروق را به اپی‌نفرین حساس کرده و تنفس سلولی، مصرف اکسیژن و متابولیسم را تحریک می‌کنند (۱۶). هورمون‌های تیروئیدی همچنین موجب سنتز پروتئین (آنزیم) $Na^{+}K^{-}ATPase$ شده و فعالیت آن را می‌افزایند و مصرف ATP را ازاین طریق افزایش می‌دهند (۱۶). متابولیسم لیپیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها نیز تحت تأثیر عملکرد غده تیروئید می‌باشد. هورمون‌های تیروئیدی نقش قابل‌توجهی در تغییرات مورفولوژیک، رفتار و فیزیولوژی ماهیان دارند (۱۷). در بسیاری از گونه‌های ماهیان تغییرات دوره‌ای مشاهده‌شده در سطح پلاسمایی هورمون‌های تیروئیدی با بلوغ جنسی همراه بوده است (۱۳).

کوسه‌ماهی جنس Chiloscyllium ازجمله منابع غذایی مناسب و مطلوب محسوب می‌شوند. این ماهیان برای تجارت صیدشده و در آکواریوم‌های عمومی نمایش داده می‌شوند. این کوسه‌ها قادرند در آکواریوم زادوولد کنند (۱۰). صید بی‌رویه این آبزی در سال‌های اخیر نسل آن‌ها را در معرض انقراض قرارداده است. هم‌چنین این کوسه‌ها در زمان زادوولد به‌سوی آب‌های کم‌عمق (که کمینه دما را برای بچه‌ها فراهم می‌کند) حرکت نموده و به همین دلیل

افزایش تخریب مناطق ساحلی خطری دیگر برای تداوم نسل آن‌ها به‌حساب می‌آید (۱).

دراین راستا و باتوجه به اهمیت اکولوژیک گربه کوسه‌ماهی عربی (*C. arabicum*)، و باتوجه به‌اینکه مطالعات محدودی در ارتباط با جنبه‌های بیولوژیک این ماهی صورت گرفته و عمده مطالعات موجود به بررسی پراکنش جغرافیایی این‌گونه می‌پردازد، مطالعه حاضر باهدف بیولوژیک این‌گونه صورت گرفت. غده تیروئید در ماهیان غضروفی همانند سایر ماهیان تأثیر به سزایی در تنظیم و کنترل فرایندهای بیولوژیک ازجمله تولیدمثل دارد. لذا در تحقیق حاضر تغییرات هیستومورفولوژیک و عملکرد غده تیروئید این ماهی در دو فصل تولیدمثلی و غیر تولیدمثلی مورد مطالعه قرارگرفت.

مواد و روشها

۵۰ قطعه ماهی *Chillodcyllium arabicum* بالغ ماده در طی فصل پاییز سال ۱۳۹۴ و فصل بهار سال ۱۳۹۵، توسط تور ترال (به‌صورت زنده)، از آب‌های بحرکان واقع در بندر هندیجان، واقع در شمال غرب خلیج‌فارس و جنوب شرق استان خوزستان (با طول جغرافیایی ۳۰ دقیقه ۴۹ درجه الی ۵۵ دقیقه۴۹ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۵۰ دقیقه ۲۹ درجه الی ۱۵ دقیقه ۳۰ درجه شمالی) صید شد (شکل۱).

شکل۱- نقشه منطقه موردمطالعه و ایستگاه نمونه‌برداری درخور بحرکان (دایره)(Google map)

نمونه‌برداری: درکل ۳۵ قطعه گربه کوسه عربی در طی فصل تولیدمثلی و ۱۵ قطعه ازاین ماهی در طی فصل غیر تولیدمثلی صید شد. در هربار نمونه‌برداری، کوسه‌ماهیان به‌طور زنده در ظروف مجهز به پمپ هوا به آزمایشگاه منتقل‌شده و در آنجا توسط عصاره گل میخک بیهوش شده و طول کل بدن توسط تخته بیومتری با دقتmm ۱ و وزن هر کوسه‌ماهی به‌وسیله ترازوی دیجیتال با دقت g۰/۰۱ اندازه‌گیری و ثبت گردید. سپس جهت ارزیابی پارامترهای خونی و سطوح هورمون‌های تیروئیدی (T3 و T4)، مقدار ml ۲/۵ خون از رگ ساقه‌ی دمی (درست در پشت باله‌ی مخرجی) توسط سرنگ هپارینه اخذ و خون به‌آرامی به داخل میکروتیوپ های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. نهایتاً خون به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه توسط دستگاه Hettich مدل D-7200 سانتریفیوژ شده و پلاسما به میکروتیوپ های جدید منتقل و تا زمان آنالیز هورمون‌های T3 و T4 و TSH، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت نمونه‌برداری از بافت تیروئید، پوست فک زیرین با ایجاد یک برش عرضی در عضله زیر فک و دو برش طولی به‌موازات هم تا نزدیکی حلق شکمی برداشته شد و سپس به‌آرامی عضله را کنار زده تا غده تیروئید مشاهده گردد، آنگاه غده به‌آرامی خارج‌شده و در محلول ثبوت بوئن قرار داده شد. نمونه‌های بافتی غده تیروئید پس از ۷۲ ساعت و تکمیل فرایند تثبیت از محلول ثبوت بوئن خارج و تا زمان انجام مراحل بعدی در الکل ۷۰ ٪ نگه‌داری شدند.

سنجش هورمون‌های تیروئیدی T3 و T4: سنجش سطوح هورمون‌های تیروئیدی T3 وT4 پلاسما، به روش الایزا (ELISA= Immunosorbent Assay Enzyme-Linked)، بااستفاده از دستگاه الایزا آنالایزر DYNEX DS2 و کیت‌های تجاری، به‌صورت تمام اتوماتیک اندازه‌گیری شد. بدین‌صورت که، نمونه مورد آزمایش با مقدار نامشخصی آنتی‌ژن روی فاز جامد (معمولاً پلیت پلی‌استیرن)، ریخته شد. سپس آنتی‌بادی بازیابی افزوده شد تا با آنتی‌ژن واکنش داده و ترکیبی ایجاد کند. آنتی‌بادی بازیابی با آنزیم پیوند کوالانسی برقرار می‌کند. بین هر مرحله پلیت با محلول پاک‌کننده ملایمی شسته شد تا هر پروتئین یا آنتی‌بادی

باقیمانده شسته شود. پیش از آخرین مرحله شست‌وشو، پلیت با اضافه کردن زیرلایه آنزیمی کشت داده شد و ماده رنگی تولید گردید. طول‌موج رنگ به‌دست‌آمده، توسط یک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده‌شده و ثبت گردید، که این طول‌موج، معرف حضور یک آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن و نیز غلظت آن بود.

سنجش هورمون TSH: اندازه‌گیری هورمون هیپوفیزی TSH، بااستفاده از روش ایرما (IRMA)، انجام گرفت. این کیت، براساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو ساندویچی فراهم‌شده است. درروش IRMA، TSH موجود در نمونه به‌عنوان آنتی‌ژن به دو آنتی‌بادی زوج اختصاصی آن (از نوع مونوکلونال موشی)، متصل می‌شود. یکی از آنتی‌بادی‌ها برروی فاز جامد (لوله‌ها)، پوشش داده‌شده و آنتی‌بادی دیگر به ید-۱۲۵ (ید نشان‌دار) متصل می‌شود. پس از آنکوباسیون، برای خارج کردن آنتی‌بادی متصل به ید-۱۲۵، لوله‌ها تخلیه و شستشو شدند. در مرحله بعد، توسط شمارنده گاما، اکتیویته موجود در هر لوله اندازه‌گیری شد. این اکتیویته، رابطه مستقیم با غلظت هورمون‌های TSH نمونه‌ها دارد. نمونه‌های مجهول، با استانداردهای TSH، مورد مقایسه قرارگرفته و غلظت نمونه‌های مجهول براساس منحنی استاندارد به دست آمد.

مطالعه ساختار بافتی غده تیروئید کوسه‌ماهی عربی: نمونه‌های بافتی تثبیت‌شده از الکل ۷۰درصد خارج‌شده و جهت انجام مراحل پاساژ بافتی شامل آبگیری، شفاف کردن و آغشتگی به پارافین به دستگاه هیستوکینت (مدل-RX 11B, Tissue tek rotary, japan) منتقل شدند.. پس از ۲۱ ساعت نمونه‌ها از دستگاه هیستوکینت خارج‌شده و توسط قالب‌های آلومینیومی به نام لوکهارت، قالب‌گیری و سپس بااستفاده از دستگاه میکروتوم (مدلLEICA0RM2245 ساخت آلمان)، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر از هریک از قالب‌های پارافینی تهیه شد. در انتها نمونه‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی معمولی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)، رنگ‌آمیزی شدند.

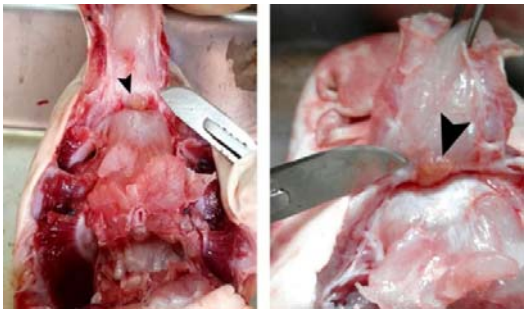
مطالعه هیستومتریک: مطالعه هیستومتریک مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده غده تیروئید ازجمله اندازه‌گیری قطر فولیکول‌ها، مساحت فولیکول‌ها و ارتفاع سلول‌های اپی-تلیال فولیکول‌ها با استفاده از بزرگنمایی‌های مختلف میکروسکوپ Olympus، انجام شد. تصاویر مناسب، توسط دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ (Microscope Dino-lite Digital)، مجهز به نرم‌افزار Dino Capture، تهیه و ذخیره شد. جهت مطالعه از هر نمونه، ۵ اسلاید، و در هر اسلاید حداقل ۳ میدان میکروسکوپی موردبررسی و ارزیابی قرارگرفت.

آنالیز آماری: داده‌های مربوط به میزان هورمون‌های تیروئیدی T3، T4 و TSH و هم‌چنین پارامترهای هیستومتریک به صورت میانگین±_خطای استاندارد، بیان شد. مقایسه میانگین داده ها بین دو فصل با استفاده از آزمون T-test در نرم‌افزار SPSS 17 انجام گرفت(۲۴). اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵٪ (P<۰/۰۵)، تعیین شد. پس از پایان تجزیه و تحلیل نمودارها در محیط Microsoft Office Excell 2010 رسم شدند.

نتایج

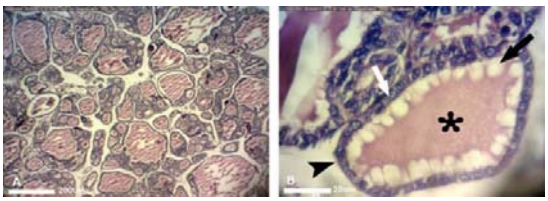
زیست سنجی کوسه ماهی عربی: میانگین طول و وزن کوسه ماهی عربی به ترتیب شامل ۵/۳۹±۵۹/۷۰ سانتی متر و ۳۰۰/۳۰±۷۹۶/۵ گرم بود.

مورفولوژی غده تیروئید: غده تیروئید گربه کوسه‌ماهی عربی در سمت شکمی حلق و در قسمت میانی عضلات فک زیرین قرارداشت. غده تیروئید این ماهی به‌صورت یک اندام مستقل، متراکم و تک لوبی به رنگ زرد کم‌رنگ در قسمت قدامی آئورت شکمی و در زیر غضروف لامی-قاعده‌ای قرارداشت و توسط کپسول شفاف نازکی پوشیده شده بود (شکل ۲).



شکل ۲- موقعیت آناتومیک غده تیروئید ماهی *C. arabicum* در زیر غضروف لامی و در قسمت حلق شکمی کوسه‌ماهی عربی

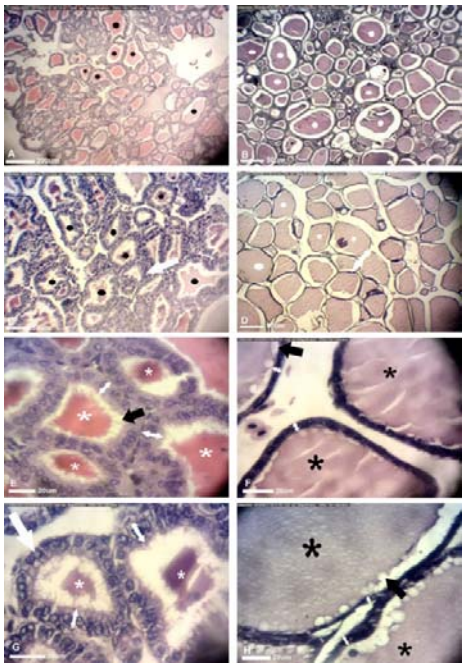
بافت غده تیروئید در *C. arabicum* متشکل از بافت پارانشیم فولیکولی و بافت داربست همبندی بود (شکل۳). فولیکول‌های تیروئیدی ساختار کروی با دیواره‌ای از سلول‌های سنگفرشی، مکعبی و یا استوانه‌ای و حفره داخلی آن‌ها توسط ماده کلوئیدی پرشده بود (شکل ۳).



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی غده تیروئید ماهی *C. arabicum*، A: فولیکول‌های تیروئیدی (H&E;×290)، B: یک فولیکول تیروئیدی (رأس پیکان سیاه)، بافت پوششی فولیکولی (پیکان سفید)، مایع کلوئیدی (ستاره سیاه) حاوی واکوئل (پیکان سیاه) (H&E;×2900).

سلول‌های پوششی فولیکولی در فولیکول‌های فعال به شکل مکعبی تا استوانه‌ای (شکل ۴) و در فولیکول‌های غیرفعال، به شکل سنگفرشی تا مکعبی کوتاه مشاهده شدند (شکل ۴). در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، ماده کلوئیدی به رنگ صورتی و روشن‌تر مشاهده گردید که در فصل تولیدمثلی حاوی واکوئل‌های فراوان و در فصل غیر تولیدمثلی دارای تعداد اندکی واکوئل بودند (شکل ۴).

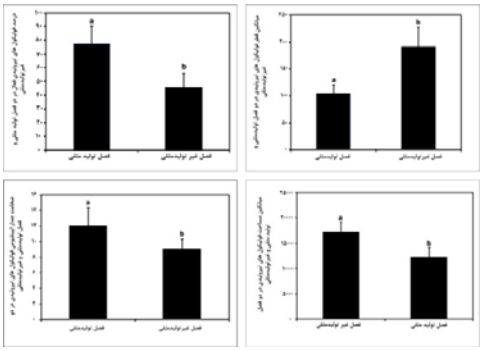
براساس نتایج هیستومتریک در تحقیق حاضر، درصد فولیکول‌های تیروئیدی فعال در فصل تولیدمثل به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای نسبت به فصل غیرتولیدمثلی بیشتر بود. فولیکول‌های تیروئیدی فعال، کوچک بوده و دارای دیواره اپیتلیومی ضخیم (بافت پوششی مکعبی تا استوانه‌ای) و مایع کلوئیدی کم و واکوئله بودند، در حالیکه، فولیکول‌های تیروئیدی غیرفعال، بزرگ بوده و دارای دیواره اپیتلیومی باضخامت کم (بافت پوششی سنگفرشی) و مایع کلوئیدی فراوان با واکوئل‌های کم بودند (شکل ۴). براساس نتایج، مشخص شد که در فصل تولیدمثلی ۷۸٪ فولیکول‌ها واکوئل‌دار و فعال و مابقی غیرفعال و بدون واکوئل بودند، درحالی‌که در فصل غیرتولیدمثلی ۵۶٪ فولیکول‌ها غیرفعال و بدون واکوئل بودند (شکل ۵). میانگین قطر فولیکول‌های کوچک و بزرگ در غده تیروئید کوسه‌ماهیان عربی در فصل غیرتولیدمثلی به ترتیب ۷۴/۵۵±۱۵۲/۵ و ۹۴/۲۱±۲۳۰/۲۹ میکرومتر اندازه‌گیری شد، در حالیکه در اندازه‌گیری‌های به‌عمل‌آمده در فصل تولیدمثل (بهار)، میانگین قطر فولیکول‌های کوچک و بزرگ به ترتیب ۱۷/۳۰±۱۳۳/۶۳ میکرومتر و ۳۶/۰۲±۱۷۰/۴۰ میکرومتر به دست آمد (شکل ۵).



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی غده تیروئید ماهی *C. arabicum* در دو فصل تولیدمثلی (A،C،E،G) و غیرتولیدمثلی (B،D،F،H)، فولیکول‌های تیروئیدی فعال (دایره‌های سیاه)، فولیکول‌های تیروئیدی غیرفعال (دایره‌های سفید)(H&E;× 725)،

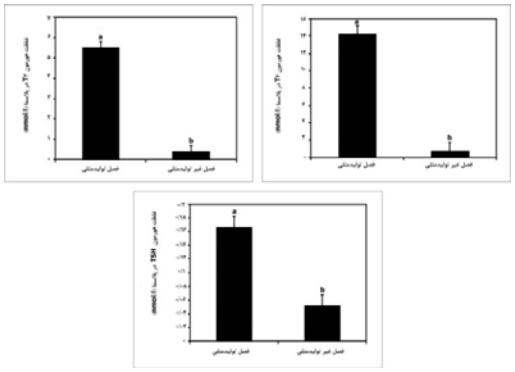
بافت پوششی فولیکولی (پیکان سفید)، مایع کلوئیدی (ستاره سیاه) حاوی واکوئل (پیکان سیاه) (H&E;×2900)، ضخامت بافت پوششی فولیکول‌های تیروئیدی (پیکان دوسر)، مایع کلوئیدی حاوی واکوئل های فراوان (ستاره سفید)، مایع کلوئیدی حاوی تعداد کمی واکوئل (ستاره سیاه). (H G, F, H&E;A:×290, B,C,D:×725, E, : ×2900)

هم‌چنین میانگین ضخامت جدار اپی‌تلیومی فولیکولهای تیروئیدی در فصل غیرتولیدمثلی (۱/۲۷±۹/۰۵ میکرومتر) به‌طور معنی‌داری کمتر از ضخامت جدار اپی‌تلیومی فولیکولهای تیروئیدی در فصل تولیدمثلی (۲/۲۹±۱۲/۰۴ میکرومتر) بود (شکل ۵). تفاوت معنی‌داری نیز در مساحت فولیکول‌های تیروئیدی در میان دو فصل مشاهده گردید، به طوریکه میانگین مساحت فولیکول‌های غده تیروئید در فصل تولیدمثلی (۷۹۶/۱±۱۲۱۸۱/۵ میکرومتر) به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کمتر از مساحت فولیکول‌های تیروئیدی در فصل غیرتولیدمثلی (۱۳۲۸۶/۹±۱۷۱۰۰/۵ میکرومتر) بود (شکل ۵).



شکل ۵- درصد فولیکول‌های تیروئیدی فعال و میانگین قطر، ضخامت جدار اپیتلیومی و مساحت فولیکول‌های تیروئیدی *C. arabicum* در دو فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی

سنجش هورمون‌های غده تیروئید: نتایج حاصل از سنجش هورمون‌های تیروئیدی در پلاسمای کوسه‌ماهی عربی (*C. arabicum*)، در دو فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی نشان داد که میان غلظت هورمون‌های T3 و T4 در دو فصل تولیدمثلی و غیر تولیدمثلی اختلاف معناداری وجود داشته (P<۰/۰۵) و در فصل تولیدمثلی غلظت هر دو هورمون به‌طور معنی‌داری بیش از فصل غیرتولید مثلی است (P<۰/۰۵) (شکل ۶). با توجه به شکل ۶ میانگین غلظت هورمون TSH در فصل تولیدمثلی در مقایسه با فصل غیرتولیدمثلی به‌طور معنی‌داری بیشتر می‌باشد (P<۰/۰۵).



شکل ۶- میانگین غلظت هورمون‌های T3، T4 و TSH در پلاسمای ماهی *C.arabicum* در دو فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی

بحث و نتیجه‌گیری

غده تیروئید، تنها غده درون‌ریزی است که از حلق مشتق شده و در تمام مهره‌داران وجود دارد (۱۵). اگرچه ساختار غده تیروئید در تمام گونه‌های مهره‌داران به‌خوبی حفظ‌شده است ولی پاسخ این غده در بدن تحت تأثیر عوامل زیست‌محیطی، تفاوت‌های مورفولوژی بسیاری را میان گونه‌ها به وجود می‌آورد (۱۵).

در مطالعه حاضر مشخص شد که غده تیروئید کوسه‌ماهی عربی اندامی مستقل و دارای بافت متراکم است. بافت غده تیروئید در فصل تولیدمثلی نسبت به فصل غیرتولیدمثلی تغییرات مشهودی پیدا کرد که دلیل بر ارتباط نزدیک میان فعالیت غده تیروئید و غدد جنسی است. در بررسی غده تیروئید سه کوسه‌ماهی Mako, Thresh shark و Blue shark مشخص شد که این غده، مستقل و متراکم، مسطح، غیرلوبوله، چندضلعی و زرد کم‌رنگ بوده که با کپسول شفاف و نازکی از جنس بافت همبند پوشیده شده است (۶). فولیکول‌ها دراین سه گونه کوسه‌ماهی بااندازه‌های متغیر مشهود بود، به‌طوری‌که در کوسه‌های ماکو غده

تیروئید دارای فولیکول‌هایی با اندازه متفاوت و بسیار کوچک، کروی با سلول‌های پوششی همراه با مایع کلوئیدی واکوئله شده بود (۶). در کوسه‌ماهی خرمن کوب فولیکول‌ها با اندازه‌های بزرگ و سلول‌های پوششی مکعبی و مایع کلوئیدی واکوئله فراوان بود، ولی در کوسه آبی نر اندازه فولیکول‌ها بزرگ با بافت پوششی استوانه‌ای، مایع کلوئیدی با لبه‌های صاف یا واکوئلیزه شده مشاهده شد (۶). در مطالعه حاضر در اکثر نمونه‌ها، حاشیه مایع کلوئیدی فولیکول‌ها به یک نسبت واکوئلیزه شده بود که نشان‌دهنده جذب فعال کلوئید و ترشح هورمون‌های تیروسیتی می‌باشد. از طرفی هیپرپلازی فولیکول‌های تیروئیدی همراه با بافت پوششی استوانه‌ای آن‌ها به دلیل زمان جفت‌گیری کوسه‌های شمال غرب اقیانوس اطلس در فصل بهار و تابستان می‌باشد که همراه با افزایش تقاضای سوخت‌وساز و افزایش فعالیت غده تیروئید است (۶).

در پژوهش حاضر متوسط میانگین قطر فولیکول در فصل تولیدمثلی به‌طور معنی‌داری کمتر از فصل غیرتولیدمثلی بود. چاکرابارتی و چاترجی (۲۰۱۴) گزارش نمود که، میانگین قطر فولیکول‌های تیروئید در ماهی *Mystus vittatus* در مرحله رشد در بازه زمانی دسامبرتا فوریه از ۰/۸۸±۲۲/۷۳ میکرومتر به ۰/۶۲±۲۹/۹۶ رسید. در مرحله بلوغ در بازه زمانی ماه مارس تا مه نیز میانگین قطر فولیکول‌ها از ۱/۴±۲۶ میکرومتر به ۱/۴±۴۰ میکرومتر و در مرحله تخم‌ریزی در بازه زمانی ژوئن تا آگوست از ۱/۲±۵۵ میکرومتر به ۱/۱±۶۸ میکرومتر رسید (۸). این محققین اعلام نمودند که در اواخر دوره بلوغ و شروع دوره تخم‌ریزی سلول‌های پوششی فولیکولی استوانه‌ای بوده و مایع کلوئیدی واکوئله شده بود که نشان از فعال بودن غده تیروئید داشت (۸). در مطالعه غده تیروئید ماهی *Tenualosa ilisha* جنس نر اعلام شد که میانگین قطر فولیکول‌های تیروئیدی در مرحله تخم‌ریزی از ۱/۲۴±۳۵/۳۰ میکرومتر به ۱/۴۸±۵۴/۶۴ میکرومتر و ارتفاع لایه سلول‌های پوششی فولیکول به حداکثر اندازه‌ی خود رسید (۹). همچنین اعلام شد در تیروئید سفره‌ماهی اقیانوس اطلس *Sabina.Dasyatis* باتوجه به فعالیت غده تیروئید بافت پوششی سلول‌های فولیکولی می‌توانند مکعبی تا استوانه‌ای باشند (۲۳).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر بر غده تیروئید کوسه‌ماهی عربی نشان داد که در فصل بهار همزمان با فاز تخم‌ریزی و تولیدمثل ماهی ارتفاع سلول‌های پوششی فولیکول‌های تیروئیدی، اختلاف معنی‌داری را نسبت به فصل پاییز نشان دادند. در پژوهش حاضر در فصل غیرتولیدمثل (پاییز)، سلول‌های پوششی فولیکول‌های تیروئید سنگفرشی و اندازه‌های فولیکول‌ها بزرگ بود، درحالی‌که در فصل تولیدمثلی (بهار)، اندازه فولیکول‌های تیروئیدی کوچک بوده و توسط سلول‌های پوششی مکعبی پوشیده شده بودند.

سلول‌های پوششی فولیکول‌های تیروئیدی در ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*)، بسته به نوع فعالیت صاف، مکعبی یا استوانه‌ای است (۱۹). این ماهی در فصل گرم سلول‌های پوششی استوانه‌ای و کلوئید درون فولیکول بازو فیلی بوده که نشان از فعال بودن غده است (۱۹). عباس و همکاران (۲۰۱۲)، غده تیروئید در هامور سفید را مطالعه نموده و اعلام کردند که این غده در این ماهی همانند دیگر ماهیان استخوانی، یک غده جمع‌وجور و بدون کپسول و از فولیکول‌های منتشر در سراسر منطقه حلقی و سطح پشتی آئورت شکمی و شریان نزدیک آبششی می‌باشد. دراین ماهی نیز فولیکول‌ها کروی بوده و چند سلول پارافولیکولر نیز در اطراف لومن مملو از مایع کلوئیدی مشاهده شد، اندازه فولیکول‌ها در فصل سرد و گرم متفاوت بود و برحسب فعالیت غده تیروئید سلول‌های پوششی فولیکول‌های تیروئیدی سنگفرشی، مکعبی و یا استوانه‌ای بودند. آن‌ها اعلام کردند که سلول‌های پوششی بلند و استوانه‌ای همراه با مایع کلوئیدی بازو فیلی حاوی

واکوئل از ویژگی‌های غده فعال در فصل گرم است که همان فصل باروری دراین ماهی می‌باشد (۴).

غده تیروئید باتولید هورمون‌های تیروکسین (T4)، تری یدوتیرونین (T3) و کلسی‌تونین در تنظیم متابولیسم بدن و همچنین در تنظیم کلسیم نقش مهمی دارد. این غده هم‌چنین در تنظیم واکنش‌های تولیدمثلی و باروری، تکامل، رشد و نمو جنینی و مغزی و هم‌چنین در فعالیت‌های زمان بلوغ و همچنین تنظیم اسمزی دارای نقش است (۳و۲۲). در مطالعه حاضر، بامطالعه غلظت هورمون‌های تیروئیدی کوسه‌ماهی عربی (*C.arabicum*)، در دو فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی مشخص شد که در فصل بهار (تولیدمثل)، غلظت هورمون T3 و T4 نسبت به فصل پاییز (غیر تولیدمثل)، افزایش معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$)، که این افزایش هورمون‌های تیروئیدی (T3,T4)، همزمان با تخم‌ریزی و باروری کوسه منطقی می‌باشد.

علیمی و همکاران (۱۳۹۳)، باانجام تحقیقی بر غده تیروئید گربه کوسه لکه‌دار، گزارش نمودند که میزان هورمون‌های T3 و T4 در فصل تولیدمثل نسبت به فصل غیرتولیدمثل افزایش چشم‌گیری داشت، بنا به نظر این محققین هورمون‌های تیروئیدی بر ترشح هورمون‌های تولیدمثلی مؤثر بوده و افزایش این هورمون‌ها در فصل تولیدمثل ضروری به نظر می‌رسد (۱). براون و تاگاوا (۲۰۰۱)، نشان دادند که هورمون‌های تیروئیدی سرعت تکوین و رشد تخم و لارو ماهی را افزایش می‌دهند. علاوه براین وضعیت تیروئیدی مادری و ورود هورمون‌های تیروئیدی به درون زرده تخم با موفقیت رشد و بقای جنین ارتباط دارد (۲۲). T4 سدیم منجر به افزایش درصد تخمه گشایی و درصد بقاء لاروها بعد از جذب کیسه زرده می‌گردد (۲). بنا به گزارش روی و همکاران (۲۰۰۰)، تزریق هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین به ماهی *Channa gachua* و *Catla catla*، باعث تحریک غده تیروئید مادری جهت افزایش جذب یدید تیروئید، سنتز هورمون‌های تیروئیدی جدید و انتقال آنها از مادر به درون زرده‌ی تخم می‌شود. هم‌چنین این محققین اعلام نمودند که ورود هورمون‌های تیروئیدی مادری به درون زرده‌ی تخم تأثیر معنی‌داری بر نمو جنین و نیز متامورفیسم گونه‌های ماهیان استخوانی داشته است (۱۸). ساچیانگ (۲۰۱۱)، اعلام کردند که غلظت هورمون‌های T3 و T4، در فصل تابستان در ماهی نر *Clarias gariepinus* افزایش می‌یابد و به اوج خود می‌رسد. آن‌ها گزارش کردند که ارتباط معنی‌داری بین افزایش میزان هورمون‌های تیروئیدی و رشد بیضه وجود دارد (۲۱).

ایلس و کایر (۱۹۹۶)، براساس سطح هورمون‌های تیروئیدی و ساختار بافتی غده تیروئید، ارتباط مستقیمی رابین فعالیت غده تیروئید و تولیدمثل ماهیان آزاد (Salmonids)، نشان دادند و گزارش نمودند که فعالیت غده تیروئید در مراحل اولیه توسعه غدد جنسی و در طول دوران تولیدمثل افزایش‌یافته و پس از تخم‌ریزی مقدار آن کاهش می‌یابد. این محققین هم‌چنین افزایش فعالیت غده تیروئید همزمان با شروع تکامل غدد جنسی و کاهش کلی سطح هورمون‌های تیروئیدی در پلاسما پس‌از مهاجرت و تخم‌ریزی را در هر دو جنس نر و ماده نشان دادند (۱۱). ایلس و کایر (۱۹۹۶)، اعلام نمودند که باوجود همبستگی زیاد میان افزایش فعالیت غده تیروئید با روند تولیدمثل، تغییر درجه حرارت آب، طول دوره روشنایی و سایر پارامترهای فصلی نیز بر پیچیدگی امر می‌افزایند (۱۱). در کوسه‌ماهیان تخم‌گذار همبستگی مثبتی بین فعالیت تیروئید و تولیدمثل می‌توان یافت و حداقل عملکرد غده تیروئید در گونه‌های نابالغ ماده و حداکثر فعالیت آن در زمان تخم‌ریزی گزارش‌شده است، هرچند این فعالیت در گونه‌های نر کمتر است (۱۱). در ماهیان خاویاری ستاره (*Acipenser stellatus*) نیز، فعالیت غده تیروئیدی همزمان با بلوغ جنسی، هنگام تخم‌ریزی و حتی مدت بسیار کوتاهی پس از تخم‌ریزی افزایش می‌یابد (۱۱).

درمجموع، نتایج تحقیق حاضر نشان داد در طی فصل تولیدمثلی، افزایش ضخامت اپیتلیوم فولیکول‌های تیروئیدی همراه باافزایش فعالیت این سلول‌ها منجر به کاهش مایع کلوئیدی موجود در درون فولیکول‌ها و افزایش واکوئل ها در حاشیه مایع کلوئیدی می‌شود. این تغییرات در ساختار بافتی غده تیروئید به افزایش تولید هورمون‌های تیروئیدی (T3 و T4) و درنتیجه، افزایش سطوح پلاسمایی این هورمون‌ها در این فصل می‌انجامد. این تغییرات مبنی بر افزایش مقدار هورمون‌های T3,T4 و TSH، و فعالیت غده تیروئید در کوسه‌ماهی عربی، در فصل تولیدمثل، نشان‌دهنده ارتباط مستقیم فعالیت غده تیروئید با فعالیت غدد جنسی می‌باشد.

منابع

۱- علیمی، ر.، سواری، ا.، موحدی‌نیا، ع.، ذاکری، م.، و سلامات، ن.، ۱۳۹۳. تغییرات هورمون‌های تیروئیدی در فصل تولیدمثل گربه کوسه لکه‌دار (*Chilodcyllium punctatum*) در خلیج‌فارس، مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۱۹۴-۱۸۹.

۲- اکبری، پ.، فریدونی، م. س.، و اخلاقی، م.، ۱۳۹۴. اثر هورمون لووتیروکسین سدیم بر درصد تخمه گشایی و بقاء لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مراحل اولیه رشد، مجله زیست‌شناسی ایران، دوره ۲۸، شماره ۲، صفحات ۱۵۳-۱۴۶.

۳- نفیسی بهابادی، م.، ۱۳۹۳. تغییر شاخص‌های رشد و پاسخ‌های هورمونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرحله انگشت قدی در سازش با شوری‌های مختلف (*Oncorhynchus mykiss*)محیط پرورشی، مجله زیست‌شناسی ایران، دوره ۲۷، شماره ۳، صفحات ۴۲۹-۴۱۷.

4- Abbas, H. H., Authman, M. M., Zaki, M. S., and Mohamed, G. F., 2012. Effect of seasonal temperature changes on thyroid structure and hormones secretion of white grouper (*Epinephelus Aeneus*) in Suez Gulf, Egypt. Life Science Journal, 9(2), PP: 700-705.

5- Blanton, M. L., and Specker, J. L., 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. Critical Reviews in Toxicology, 37, PP: 97-115.

6- Borucinska, J. D., and Tafur, M., 2009. Comparison of histological features, and description of histopathological lesions in thyroid glands from three species of free-ranging sharks from the northwestern Atlantic, the blue shark, Prionace glauca (L.), the shortfin mako, *Isurus oxyrhinchus* Rafinesque, and the thresher, *Alopias vulpinus* (Bonnaterre). Journal of Fish Diseases, 32, PP: 785–793.

7- Brown, S. B., Adams, B. A., Cyr, D. G., and Eales, J. G., 2004. Contaminant effects on the teleost fish thyroid. Environmental Toxicology and Chemistry, 23, PP: 1680-1701.

8- Chakrabarti, P., and Chatterjee, N., 2014. Histological changes in the activity of the thyroid follicles and its impact on ovarian tissues in *Mystus vittatus* (Bloch, 1794) during growth, maturation and spawning phases. Cibtech Journal of Zoology, 3(1), PP: 27-36.

9- Chakrabarti, P., and Ghosh, S. h., 2015. Changes in the histological architecture of thyroid follicles and testicular tissues during growth, maturation and spawning phases in *Tenualosa ilisha* (Hamilton). Journal of Entomology and Zoology Studies. 4(1), PP: 534-539.

10- Compagno, L. J. V., 2002. Sharks of the world: An Annotated and illustrated catalogue of shark species know to Date (volume2), Rome: Food and Agriculture organization of the united Nation, PP: 167-168.

11- Cyr, D. G., Eales, J. G., 1996. Inter relationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. Reviews in *Fish Biology* and Fisheries, 6, PP: 165-200.

12- Ebert, D. A., Ho, H., White, W. T., 2013. Introduction to the systematics and biodiversity of sharks, rays, and chimaeras (Chondrichthyes) of Taiwan. 3752(1), PP: 5–19.

13- Eales, J. G., Modes of action and physiological effects of thyroid hormones in fish. In: M. Reinecke, G.; Meekan, M. G., Bradshaw, C. J. A., Press, M., McLean, C., Richards, A., Quasnichka, S., Taylor, J. A., 2006. Population size and structure of whale sharks (*Rhincodon typus*) at Ningaloo Reef, Western Australia.

Marine Ecology Progress Series, 319, PP: 275-285

14- Musick, J. A., Harbin, M. M., and Compagno, L. J., 2004. Historical zoogeography of Selachii. CRC. Marine Biology, 33 p.

15- Kunz, Y. W., 2004. Developmental Biology of Teleost Fishes. Springer: Norwell, MD, 636 p.

16- Norris, D. O., 1997. Vertebrate Endocrinology. San Diego, CA: Academic Press, 55-61.

17- Power, D. M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M. A., Bjornsson, B. T., Einarsdottir, I. E., Canario, A. M., Sweeny, G. E., 2001. Thyroid hormones in growth and development of Wsh. Comparative Biochemistry and Physiology, C. 130, PP: 447–459.

18- Roy, P., Datta, M., Dasgupta, S., and Bhattacharya, S., 2000. Gonadotropin-releasing hormone stimulates thyroid activity in a freshwater murrel, *Channa gachua* (ham.), and Carps, *Catla catla* (ham) and *Cirrhinus mrigala* (ham). General Comparative Endocrinology, 117(3), PP: 456-463.

19- Salamat, N., Havasi, M., Earfani Majd, N., and Savari, A., 2012. Seasonal change of thyroid histomorphological structure and hormone production in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) in the Persian Gulf. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 11(4), PP: 840-848.

20- Smits, G., Olatunbosun, O., Delbaere, A., Pierson, R., Vassart, G., and Costagliola, S., 2003. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. New England Journal of Medicine, 349(8), PP: 760-766.

21- Suchiang, P., 2011. Variations in the Plasma Levels of Thyroid Hormones and Testicular Activity in the Male Air-breathing Catfish (*Clarias gariepinus*) over the Annual Cycle. International Journal of Biology, 3(3), PP: 33-39.

22- Tagawa, M., and Brown, C. L., 2001. Entry of thyroid hormones into tilapia oocytes. Comparative Biochemistry and Physiology, B. 129, PP: 605–611.

23- Volkoff, H., Wourms, J. P., and Snelson, F. F., 1999. Structure of the thyroid gland, serum thyroid hormones, and the reproductive cycle of the Atlantic stingray, *Dasyatis Sabina*. Journal of Experimental Biology, 284(5), PP: 505-516.

24- Olanrewaju, A. N., Kareem, O. K., Nyaku, R. E., Tubo, M. T., 2017. Length-Weight and Length-Length Relationships of *Heterotis niloticus*)Cuvier, 1829) and *Raiamas senegalensis*) Steindachner, 1870). Journal of AquacultureResearch & Development, 11, PP: 2-5.

Study of thyroid histophysiological alterations in *Chiloscyllium arabicum* from the Persian Gulf in breeding and non - breeding seasons

Matorian H.[1], Salamat N.[2] and Movahedinia A.A.[2]

[1] Dept. of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Marine Biology, Faculty of Marine Science, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran.

Abstract

In the present investigation, 50 mature Arabian carpet shark (C*hiloscyllium arabicum)* were caught at the Bahrakan Port, located at the north of the Persian Gulf, in both autumn (non-breeding) and spring (breeding) seasons. Blood samples were collected from the caudal vein and the plasma was separated. Triiodothyronine (T3), Thyroxin (T4) and thyroid stimulating hormone (TSH) were measured in plasma samples using ELISA method. Also, tissue samples were taken from thyroid and fixed in bouin's solution. Tissue samples pass through the routine histological method and 5-6 µm thick sections were prepared. Tissue sections were stained using hematoxylin and eosin method. Based on the results, the thyroid gland was observed as a capsulated compact unilobed gland in *C. arabicum*. Thyroid gland composed of round follicles coated with follicular cells varied in shape based on the thyroid activity during two breeding and non-breeding seasons. Thyroid follicles were filled with the gelatinous colloid with vacuoles. In the reproduction season, most of the thyroid follicles were small in size with a layer of high cuboidal epithelial cells and high number of vacuolated colloid; however, the large follicles coated with squamous epithelium and less vacuolated colloid were common in the non-breeding season. On the other hand, the amounts of T3, T4 and TSH were significantly higher in the breeding than that in the non-breeding seasons. The results showed that the height of thyroid follicles epithelium and plasma concentration of thyroid hormones (thyroid activity) in *C. arabicum* increased significantly during the breeding season. It is suggested that the seasonal changes in thyroid gland were closely related to sexual changes in this fish.

Key words: C*hiloscyllium arabicum*, Thyroid gland, T3, T4, TSH.