

بررسی ساختار و فراساختار بافت آبششی و مکانیابی سلولهای کلراید آبششی به روش ایمونوهیستوشیمی در بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)

زهرا خوشنود^{۱*}، شهلا جمیلی^۱، صابر خداپنده^۲، علی ماشینچیان مرادی^۱ و عباسعلی مطلبی^۳

^۱ تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم دریایی، گروه بیولوژی دریا

^۲ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی، گروه بیولوژی دریا

^۳ تهران، موسسه تحقیقات شیلات ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۱۹

چکیده

به منظور بررسی ساختار آبششی ماهی سفید دریای خزر از بچه ماهیان سن رهاسازی (۲۱-۳۳ میلی گرمی) استفاده گردید. مطالعه‌ی بافت‌شناسی نشان داد که در این بچه‌ماهیان سیستم آبششی شامل ۴ کمان آبششی در هر طرف سر، یک سودوبرانش در هر طرف سر و یک همی برانش در بخش خلفی محفظه‌ی آبششی در هر طرف سر می‌باشد. بر روی هر کمان آبششی رشته‌ها و تیغه‌های آبششی قرار دارند. بافت سودوبرانش از نظر ظاهری مشابه برانش اصلی بوده اما از ساختارهای لاملا مانندی چسبیده به یکدیگر تشکیل شده است. مکانیابی ایمونوهیستوشیمیایی سلولهای کلراید آبششی نشان داد که این سلولها بر روی کمانها، رشته‌ها، در پایه‌ی لاملاها، سودوبرانش و همی برانش متصل به دیواره‌ی خلفی محفظه‌ی آبششی قرار دارند. اندازه‌گیری این سلولها نشان داد که میانگین طول 9.70 ± 0.28 میکرومتر و میانگین عرض 6.83 ± 0.24 میکرومتر می‌باشد. مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که بیشترین سلولهای سطحی بافت آبشش سلولهای سنگفرشی دارای چین‌خوردگی‌های رأسی می‌باشند و در میان آنها سلولهای کلراید که دارای چاله‌ی رأسی هستند دیده می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آبشش، سلولهای کلراید، ماهی سفید، ایمونوهیستوشیمی، میکروسکوپ الکترونی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۴۴۶۹۹۰، پست الکترونیکی: ZKhoshnood@gmail.com

مقدمه

این گونه به رودخانه‌ها آغاز گردید مشخصاً ذخایر این ماهی را تحت تاثیر قرارداد. در حال حاضر، سالیانه بیش از ۱۵۰ میلیون قطعه بچه ماهی انگشت قد سفید رهاسازی شده و این امر نقش مهمی در حفظ و بازسازی ذخایر این گونه به شمار می‌رود (۳۵). در زمینه بررسی فیزیولوژی سیستم تنظیم اسمزی، آبشش مهمترین اندامی است که عملکرد تنظیم اسمزی را بر عهده دارد و در اپی‌تلیوم آبششی، سلولهای کلراید که دارای دانسیته بالایی از آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase هستند، مهمترین نقش را در روندهای

ماهی سفید با نام علمی *Rutilus frisii kutum* از خانواده Cyprinidae، یکی از مهمترین و با ارزش‌ترین ماهیان نواحی جنوبی دریای خزر می‌باشد. این ماهی کلیه مراحل زندگی خود (از قبیل تغذیه، رشد و نمو و...) را در دریا سپری و برای تولیدمثل وارد آب‌های شیرین رودخانه‌ها می‌شود و در ۳ تا ۴ سالگی به بلوغ جنسی می‌رسد. ماهی سفید دریای خزر یک گونه‌ی مهم اقتصادی منطقه به شمار می‌رود. برنامه‌ی حفاظت از ماهی سفید دریای خزر که در سال ۱۹۸۲ با رهاسازی بچه‌ماهیان انگشت قد فرم بهاره‌ی

تاثیر فاکتورهای مختلف محیطی بر این بافت را مورد بررسی قرارداد.

مواد و روشها

بچه ماهیان ۲۱-۳۳ میلی گرمی (سن رهاسازی) در مرداد ۱۳۹۰ از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان شهید انصاری رشت تهیه شدند. ماهیان پس از اندازه گیری طول و وزن جهت مطالعات بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی در محلول بوئن مورد فیکس قرار گرفتند. جهت انجام مطالعات بافت-شناسی، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن فیکس شدند. پس از آن چندین مرتبه با الکل اتانول ۷۰٪ مورد شستشو قرار گرفته و سپس توسط الکل اتانول های ۹۵٪ و ۱۰۰٪ و نهایتاً توسط الکل بوتانول آبگیری شدند. نمونه ها پس از قرارگیری به مدت ۳ ساعت در زایلن، به منظور پارافینه کردن، در داخل آون در پارافین مایع قرار داده شدند و پس از آن توسط پارافین (Merck) قالب گیری شدند. از بافت ها برش هایی به ضخامت ۶ میکرومتر توسط میکروتوم (Leica RM2255) تهیه شد. لامها پس از نگهداری به مدت یک شب در دمای اتاق و پس از آن پارافین زدایی توسط زایلن به روش هماتوکسیلین-اِئوزین (H&E) توسط دستگاه رنگ-آمیزی (Microm) رنگ آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری (Nikon DS-Fi1) مورد مطالعه و عکسبرداری قرار گرفتند (۱۷، ۲۲).

جهت مکان یابی آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase به روش ایمونوهیستوشیمی، نمونه ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن فیکس گردیدند و پس از طی مراحل آبگیری، شفاف سازی و قالب گیری که در بخش هیستولوژی شرح داده شد، به کمک میکروتوم برش های ۶ میکرومتری از بافت ها تهیه و بر روی لام های شیشه ای مخصوص که قبلاً آماده سازی شده بودند قرار داده شدند. آماده سازی این لام ها به روش زیر صورت گرفت.

لام ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول حاوی ۹۰ میلی لیتر

تنظیم یونی و اسمزی بر عهده دارند (۱۳). اپی تلوم آبشش از چند نوع سلول مختلف تشکیل شده است که مهمترین آنها سلول های سنگفرشی (Pavement Cell)، سلول های کلراید (Chloride Cell) و سلول های موکوسی (Mucous Cell) هستند. سلول های سنگفرشی و سلول های کلراید (سلول های غنی از میتوکندری یا یونوسیت) به ترتیب بیش از ۹۰٪ و کمتر از ۱۰٪ سطح اپی تلوم را به خود اختصاص می دهند. هر چند که سلول های سنگفرشی بیشتر سطح آبشش را می پوشانند اما نقش غیرفعالی در عملکردهای تنظیم اسمزی دارند، این سلول ها بیشتر مکان تبادل گازهای تنفسی هستند چرا که سلول هایی بسیار نازک با سطح رأسی بسیار گسترده می باشند (۱۳). تمامی انواع سلول های بافت آبششی جایگاه بیان ژن Na^+ , K^+ -ATPase هستند، اما در این میان دانسته این آنزیم در سلول های کلراید از همه این سلول ها بیشتر بوده و به رقمی در حدود ۱۰۸ آنزیم به ازای هر سلول می رسد، به همین سبب مکان یابی آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی زیر واحدهای آنزیم از روش های مطمئن به منظور مکان یابی سلول های کلراید آبششی محسوب می گردد (۲۸) سلول های کلراید مهمترین جایگاه تبادلات یونی هستند، این سلول ها علاوه بر تنظیم تعادل اسیدی-بازی مسئول ترشح یون ها در آب شور و جذب یونها در آب شیرین به شمار می روند (۳۴).

از آنجائیکه ماهی سفید دریای خزر یک ماهی رود کوچ بوده که در اکوسیستم در معرض خطر دریای خزر زیست می کند و در معرض انواع آلاینده ها و صید بی رویه قرار دارد، شناخت فیزیولوژی این ماهی و بویژه فیزیولوژی تنظیم اسمزی آن، به دلیل ویژگی مهاجرت بین آب های شور و شیرین از اهم مطالعات انجام شده بر روی این ماهی به شمار می رود و در این میان شناخت مکان و پراکنش سلول های کلراید، به عنوان اصلی ترین فاکتورهای تنظیم اسمزی، دارای اهمیت خاصی است. با شناخت ساختمان دقیق بافت آبششی در این ماهی می توان در مطالعات آینده

ایمونوهیستوشیمی سلول‌های کلراید آبششی توسط نرم افزار Image Tool مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند، سلول‌ها در ترانسکت‌های تصادفی با ابعاد $16/17 \times 83/163$ میکرومتر مورد شمارش و اندازه‌گیری قرار گرفتند. در هر سلول بیشترین ارتفاع به عنوان طول و بیشترین پهنا به عنوان عرض در نظر گرفته شد (۳ و ۳۱).

به منظور مطالعه‌ی بافت آبششی با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) کمان‌های آبششی در ابتدا به مدت ۱۲ ساعت در محلول حاوی ۵۰٪ گلو تار آلدهید $2/5\% + 50\%$ PBS (فسفات بافر سالین) فیکس شدند. پس از گذشت ۱۲ الی ۲۴ ساعت، به محلول PBS منتقل گردیدند و در این مرحله، فیکس نمونه‌ها به پایان رسید. به منظور فیکس ثانویه (Post fix) نمونه‌ها پس از قرار گرفتن در تتراکسیداسمویم به مدت ۱ ساعت توسط محلول بافر PBS و آب مقطر مورد شستشو قرار داده شده و سپس به اتانول ۷۰٪ منتقل گردیدند. پس از آگیری از نمونه‌ها توسط سری افزایشی اتانول نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه فریزدرایر خشک شده و سپس بلافاصله توسط طلا پوشش داده شدند و در نهایت توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره KYKY-EM3200 مورد مطالعه و عکسبرداری قرار گرفتند (۱۴، ۱۸).

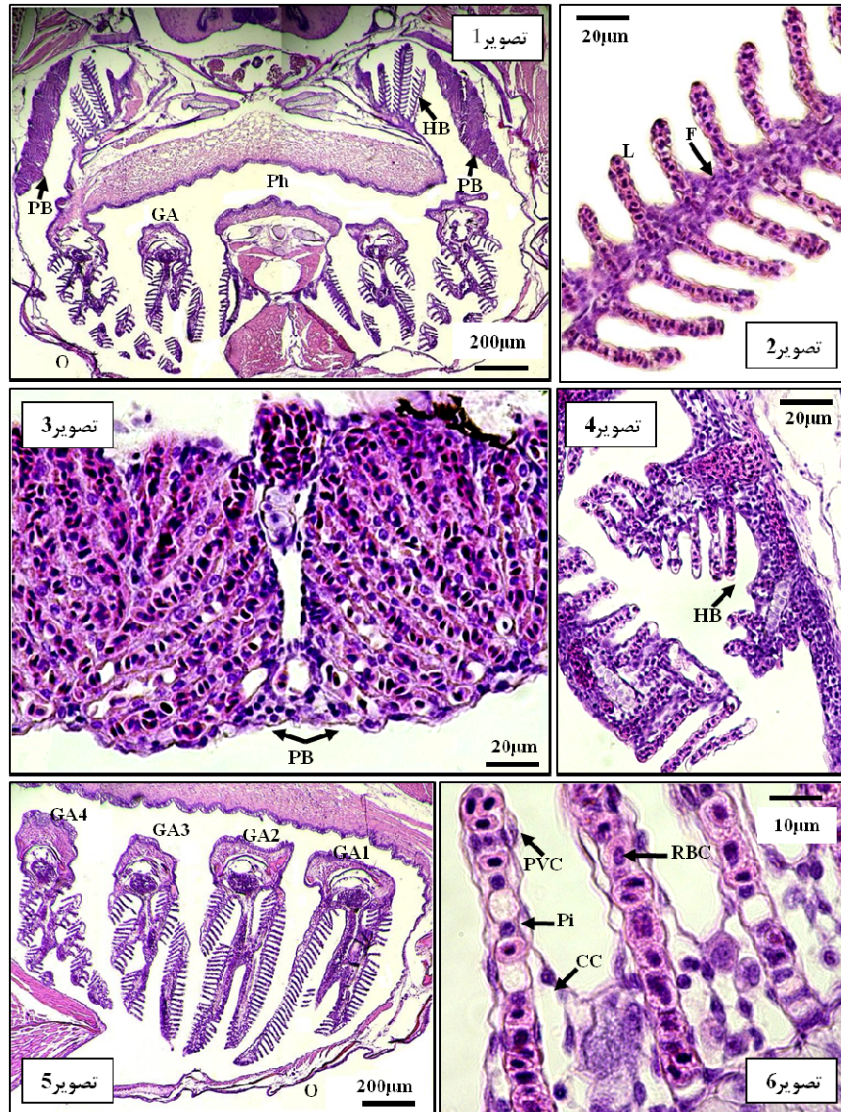
نتایج

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در بچه ماهی سفید در سن رهاسازی در هر طرف سر ۴ کمان آبششی وجود دارد (تصویر ۱ و ۵)، بر روی هر کمان آبششی ۲ ردیف رشته-های آبششی که حاوی تیغه‌های آبششی می‌باشند قرار گرفته است (تصویر ۲)، همچنین در بخش خلفی- فوقانی محفظه‌ی آبششی یک همی‌برانش متصل به دیواره وجود دارد که از تعدادی رشته‌ی آبششی حاوی تعدادی تیغه‌ی آبششی تشکیل یافته است (تصویر ۱ و ۴) و نیز در بالای محفظه‌ی آبششی در هر طرف سر یک سودویرانش دیده می‌شود که ظاهری شبیه به تیغه‌های آبششی چسبیده به

اتانول $90\% + 10\%$ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک قرار داده شدند، پس از طی این مدت لام‌ها با آب مقطر شستشو داده شده و سپس در دمای 37° سانتی‌گراد در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت خشک گردیدند و تا زمان استفاده در جعبه‌ی لام و به دور از هر گونه آلودگی نگهداری گردیدند. رقیق کردن و تهیه‌ی آنتی‌بادی‌ها به روش زیر انجام گرفت. از محلول اصلی آنتی بادی IgG α_5 با غلظت ۲۹ میکرولیتر در میلی‌لیتر استفاده شد و از این منبع برای 37° لام، ۱۴۸۰ میکرولیتر از آنتی بادی IgG α_5 به اضافه‌ی ۲۲۲۰ میکرولیتر محلول Regiler+PBS رقیق‌سازی شده و به هر لام ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول اضافه گردید. به منظور تهیه و آماده سازی آنتی‌بادی دوم (FITC) برای 40° لام، ۵۳ میکرولیتر از آنتی بادی FITC با ۳۹۴۷ میکرولیتر محلول Regiler+PBS رقیق شده و به همه‌ی لام‌ها اضافه گردید (هر لام ۱۰۰ میکرولیتر). در انجام ایمونوهیستوشیمی آنتی-بادی اول به ۳ لام اضافه نگردید، اما آنتی بادی دوم به همه‌ی لام‌ها افزوده شد، این لام‌ها به عنوان شاهد منفی جهت مقایسه با لام‌های دیگر در نظر گرفته شدند. تمامی مراحل کار در جعبه‌ی مرطوب مخصوص صورت گرفت و از مرحله‌ی افزودن آنتی‌بادی دوم، لام‌ها در تاریکی مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت انجام ایمونوهیستوشیمی پس از پیرافین‌زادی لام‌ها توسط زایلن، نمونه‌ها در سری کاهشی اتانول (۱۰۰٪، ۹۵٪، ۹۰٪، ۷۰٪ و ۵۰٪) قرار داده شدند و پس از قرار گرفتن در محلول بافر PBS، آنتی‌بادی اول (IgG α_5) به مدت ۲ ساعت بر روی لام‌ها قرار داده شد، پس از شستشوی لام‌ها در PBS آنتی‌بادی دوم (FITC) به مدت ۹۰ دقیقه بر روی لام‌ها قرار گرفت و در نهایت شستشوی لام‌ها و چسباندن لامل بر روی آنها با چسب مخصوص لام‌های ایمونوهیستوشیمی انجام شد. پس از مونتاژ، لام‌ها با میکروسکوپ نوری فلورسنت مورد مطالعه قرار گرفته و بوسیله‌ی دوربین Olympus DP72 از آنها عکسبرداری صورت گرفت (۱۷، ۱۶).

با استفاده از تصاویر تهیه شده در تکنیک

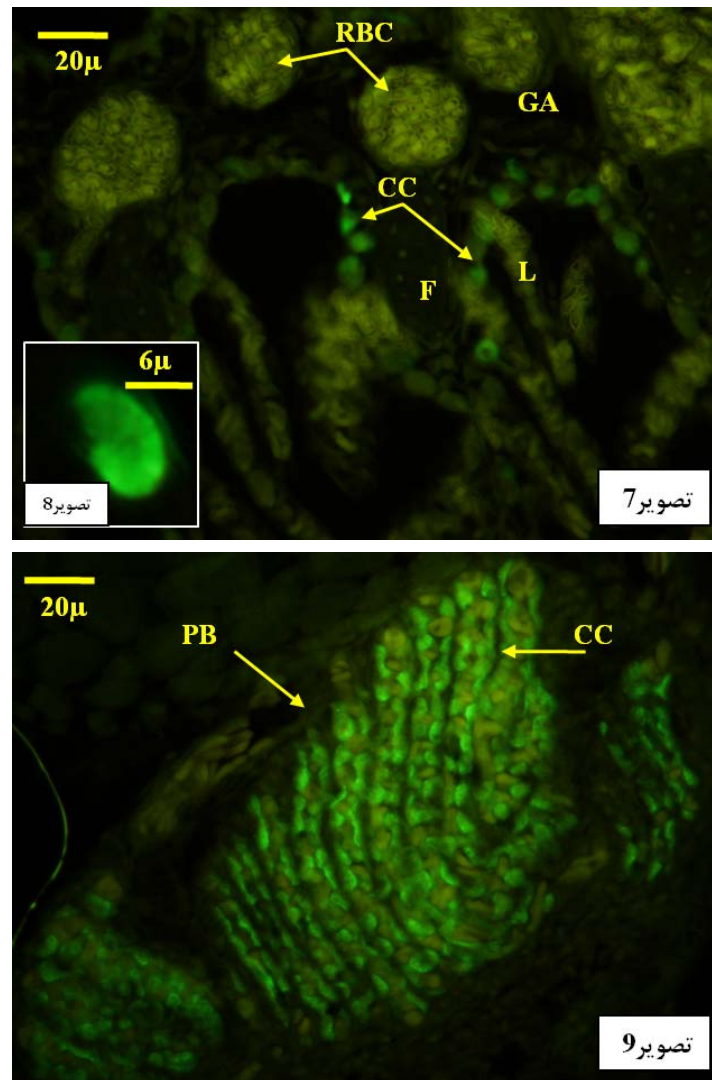
یکدیگر دارد (تصویر ۱ و ۳) مطالعات نشان داد که سلول-های سطحی بافت آبشش را سلول‌های سنگفرشی (Pavement Cell) تشکیل داده و در پایه‌ی تیغه‌های استونی شکل پیلار شکل گرفته است (تصویر ۶). همچنین فاصله‌ی میان دو اپیتلیوم تیغه‌های آبششی توسط سلول‌های



تصویر ۱- تصویر بافت شناسی کلاسیک (H & E): برش عرضی محفظه‌های آبششی در دو طرف سر بچه ماهی سفید دریای خزر. تصویر ۲- تصویر بافت شناسی کلاسیک (H & E): رشته‌ی آبششی حاوی تیغه‌های آبششی. تصویر ۳- تصویر بافت شناسی کلاسیک (H & E): سودوبرانش (آبشش کاذب). تصویر ۴- تصویر بافت شناسی کلاسیک (H & E): همی برانش در بخش خلفی- فوقانی محفظه‌ی آبششی حاوی رشته‌ها و تیغه‌های آبششی. تصویر ۵- تصویر بافت شناسی کلاسیک (H & E): چهار کمان آبششی در هر طرف سر قرار گرفته و سرپوش آبششی محفظه‌ی آبششی را از محیط بیرون جدا کرده است. تصویر ۶- تصویر بافت شناسی کلاسیک (H & E): سلول‌های تشکیل دهنده‌ی بافت آبششی. PB: Pseudo Branch سودوبرانش (آبشش کاذب)، GA: Gill Arch (کمان آبششی)، Ph: Pharynx (حلق)، HB: Hemi Branch (همی برانش)، O: Operculum (اپرکول (سرپوش آبششی)، F: Filament (رشته‌ی آبششی)، L: Lamellae (تیغه‌ی آبششی)، PVC: Pavement Cell (سلول سنگفرشی)، Pi: Pillar Cell (سلول پیلار (سلول ستونی)، RBC: Red Blood Cell (گلبول قرمز خون، CC: Chloride Cell (سلول کلراید).

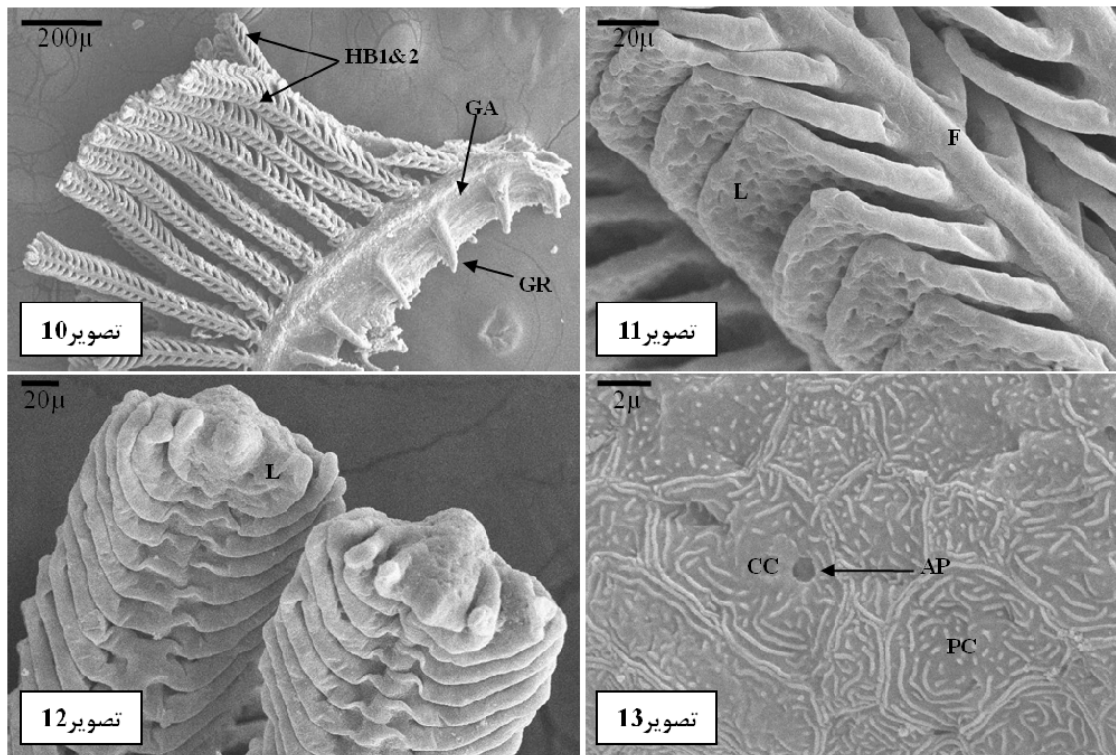
نتایج اندازه‌گیری این سلول‌ها نشان داد که میانگین بیشترین کشیدگی سلول‌ها (طول) برابر با $9/70 \pm 0/28$ میکرومتر و میانگین بیشترین پهنای آنها (عرض) $6/83 \pm 0/24$ میکرومتر می‌باشد. همچنین نتایج شمارش سلول‌های کلراید آبششی نشان داد که در هر میلی‌مترمربع از بافت آبشش حدود ۵۰۱ سلول کلراید وجود دارد.

مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان داد که سلول‌های کلراید آبششی در بچه ماهیان سفید دریای خزر بر روی کمان آبششی، بر روی فیلامنت‌ها و در پایهی لاملاها، سودوبرانش و همی‌برانش وجود دارند (تصاویر ۷ و ۹). از نظر ظاهری اغلب این سلول‌های گرد تا تخم‌مرغی شکل بوده و بیشترین میزان فلورسنت را در غشاهای قاعده‌ای-جانبی آنها می‌توان مشاهده کرد (تصویر ۸).



تصویر ۷- تصویر ایمونوهیستوشیمی: بافت آبشش، سلول‌های کلراید به رنگ سبز درخشان قابل تشخیص هستند.

تصویر ۸- تصویر ایمونوهیستوشیمی: تصویر بزرگ شده از یک سلول کلراید که بیشترین میزان فلورسانس در غشاهای قاعده‌ای-جانبی آن دیده می‌شود. تصویر ۹- تصویر ایمونوهیستوشیمی: سودوبرانش (آبشش کاذب) که دارای ساختارهایی شبیه با لاملا بوده و دارای تعداد زیادی سلول کلراید می‌باشد. PB: سودوبرانش (آبشش کاذب)، GA: کمان آبششی، F: فیلامنت (رشته‌ای آبششی)، L: لاملا (تیغه‌ای آبششی)، RBC: گلبول قرمز خون، CC: Chloride Cell (سلول کلراید).



تصویر ۱۰- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): بخشی از یک کمان آبششی. تصویر ۱۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): رشته ی آبششی حاوی تیغه های آبششی. تصویر ۱۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): بخش انتهایی دو رشته ی آبششی که حاوی تیغه های آبششی می باشند. تصویر ۱۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): سلول های سنگفرشی دارای چین خوردگی های سطحی و سلول های کلراید که علاوه بر چین خوردگی های رأسی دارای چاله ی رأسی نیز می باشند. GA: Gill Arch (کمان آبششی)، F: Filament (فیلامنت) (رشته ی آبششی)، L: Lamellae (لاملا) (تیغه ی آبششی)، CC: Cell (سلول کلراید)، PC: Pavement Cell (سلول سنگفرشی)، AP: Apical Pit (چاله ی رأسی)، HB: Hemi Branch (همی برانش)، GR: Gill Racker (خار آبششی).

های کلراید قرار دارند که بوسیله ی چاله ی رأسی قابل تشخیص هستند (تصویر ۱۳).

بحث و نتیجه گیری

بدلیل آسانی جداسازی بافت آبشش و نیز بدلیل شاخص بودن سلول های این بافت جهت برآورد وضعیت تنظیم اسمزی ماهی، تاکنون مطالعات مختلفی بر روی بافت آبشش ماهیان گونه های مختلف، اثرات شوری بر فاکتورهای خونی و یا هورمونی ماهی سفید در مراحل مختلفی از زندگی صورت گرفته است (۸ و ۲، ۴، ۵، ۷)، اما مکان یابی سلول های کلراید آبششی در ماهی سفید دریای

مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که همانطور که در مطالعات هیستولوژی مشاهده گردید هر کمان آبششی حاوی دو ردیف رشته های آبششی می باشد (تصویر ۱۰) که در هر دو سمت رشته های آبششی نیز تیغه های آبششی قرار گرفته اند و این تیغه ها تا انتهای رشته ی آبششی دیده می شوند (تصاویر ۱۱ و ۱۲)، همچنین خارهای آبششی بسیار بلند نیز بر روی بخش خلفی کمان های آبششی قابل تشخیص هستند (تصویر ۱۰). بیشترین تعداد سلول های سطح بافت آبششی را سلول های سنگفرشی تشکیل می دهند که سطح بیرونی و فوقانی آنها دارای چین خوردگی های بسیار ظریفی می باشد و در کنار آنها سلول-

خزر، به روش ایمونوهیستوشیمی، که یکی از مطمئن ترین روش های آزمایشگاهی شناسایی و تشخیص سلول های کلراید به شمار می رود، برای نخستین بار در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین در بسیاری از مطالعات بافت شناسی که بر روی بافت آبششی صورت می گیرد کمان های آبششی جدا شده مورد مطالعه قرار گرفته اند (۱، ۹۶). این در حالی است که در مطالعه حاضر محفظه ی آبششی بطور کامل و بدون جدا شدن از سر ماهی مورد مطالعه قرار گرفت و بر این اساس نتایج مطالعه ی حاضر نشان دهنده ی ساختار کامل بافت آبششی و ضامم آن در ماهی سفید دریای خزر برای نخستین بار می باشد.

نتایج مطالعه ی حاضر در بخش بافت آبششی نشان داد که در ماهی سفید دریای خزر، بافت آبششی، متشکل از چهار کمان آبششی در هر طرف سر، یک سودوبرانش آبششی در هر طرف سر و یک همی برانش متصل به دیواره ی محفظه ی آبششی می باشد و نتایج بخش ایمونوهیستوشیمی نشان داد که در این ماهی علاوه بر حضور سلول های کلراید در بخش هایی مشخصی از بافت آبششی نظیر کمان های آبششی و رشته های آبششی که در سایر گونه ها نیز بوفور گزارش شده است. سلول های کلراید در همی برانش متصل به دیواره ی خلفی- فوقانی محفظه ی آبششی و نیز سودوبرانش نیز دیده می شوند. بیش از ۲۰۰ سال پیش، (Broussonet) (۱۷۸۵) اعلام کرد که سودوبرانش ساختاری کوچک و مشابه با آبشش بوده که عملکرد تنفسی دارد، اما مطالعات بعدی نشان داد که این بافت نقشی در تنفس ماهیان بالغ ندارد (۲۷). در سال های اخیر مطالعات مختلف نقش اندوکرین (۱۰)، عصبی- ترشحی در ماهیان تلئوست دریایی و مصبی (۱۹)، اندام فراهم کننده ی اکسیژن (۲۳)، نگهدارنده ی فشار طبیعی چشم به عنوان یک شبکه ی مویرگی رته- میرایی (۲۵ و ۳۲)، اندام حسی (۱۱)، و بسیاری دیگر از اعمال مختلف را به این بافت نسبت داده- اند اما نقش اساسی آن همچنان ناشناخته باقی مانده است.

سودوبرانش در ماهیان تلئوست بطور کلی به عنوان یک همی برانش تغییر شکل یافته از کمان آبششی ماندیولار شناخته می شود که در بخش فوقانی محفظه ی آبششی قرار گرفته است (۲۶)، اما بدلیل تفاوت در اندازه، محل قرار گرفتن و نیز حضور یا نبود آن در گونه های مختلف ماهیان، همچنان یکی از موارد مطالعه در ماهیان به شمار می رود (۲۷). این در حالی است که در میان ۲۳۸ خانواده- ی ماهیان تلئوست، سودوبرانش تقریباً در تمامی گونه ها دیده می شود و تنها در گونه های معدودی از راسته ی Anguilliformes، زیر راسته ی Siluroidei و تمامی گونه- های جنس های *Gymnarchus* و *Cobitis* دیده نمی شود (۲۷). با توجه به حضور پرتعداد سلول های کلراید در سودوبرانش ماهی سفید دریای خزر می توان نقش تنظیم اسمزی را نیز به سایر نقش های سودوبرانش که در مطالعات مختلف برای آن بر شمرده شده است افزود.

نتایج مطالعه ی ایمونوهیستوشیمی نشان داد که بیشترین ایمونوفلورسنت در بخش قاعده ای - جانبی سلول های کلراید دیده می شود و این با نقش جذب فعال این سلول ها با استفاده از آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase مطابقت دارد. نتایج مطالعات انجام شده روی سایر گونه ها به روش ایمونوهیستوشیمی و ایمونوگلد نیز به حضور این آنزیم در بخش قاعده ای- جانبی سلول های کلراید اشاره دارد (۱۳، ۱۵، ۲۴ و ۲۸).

از سوی دیگر نتایج شمارش سلول های کلراید در آبشش بچه ماهیان سفید دریای خزر نشان داد که در هر میلی مترمربع از سطح این بافت حدوداً ۵۰۱ سلول کلراید وجود دارد که این سلول ها بر روی کمان های آبششی، رشته های آبششی، در پایه ی تیغه های آبششی و نیز بر روی همی- برانش دیواره ی قدامی محفظه ی آبششی قرار گرفته اند. براساس مطالعات (Chang, Wong) (۲۰۰۱) در هر میلی مترمربع از بافت آبشش مارماهی ژاپنی، *Anguilla japonica* (۵۰۰ گرمی) ۱۰۰۶ سلول کلراید وجود دارد،

آبششی بچه ماهی سفید دریای خزر عموماً از نوع سوم (Deep hole) می‌باشند، از آنجاییکه نوع سوم سلول‌های کلراید اصولاً سلول‌هایی جهت سازگاری با شوری می‌باشند (۲۰)، به نظر می‌رسد که حضور این سلول‌ها در اپیتلیوم آبششی بچه ماهیان سفید دریای خزر در سن رهاسازی، آمادگی وضعیت فیزیولوژیک این ماهیان را جهت مواجهه با شوری را نشان می‌دهد. همچنین با توجه به حضور پرتعداد یونوسیت‌ها در همی برانش متصل به دیواره محفظه‌ی آبششی و نیز سودوبرانش و برانش اصلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بچه ماهیان سفید دریای خزر در سن رهاسازی به آمادگی لازم از نظر سیستم تنظیم اسمزی جهت ورود به آب با شوری بالاتر نسبت به محیط زندگی قبلی خود (رودخانه به دریا) رسیده‌اند.

تقدیر و تشکر

از آقایان مهندس صمد درویشی، مهندس نظافت، مهندس عابدین زاده، دکتر رضا خوشنود، دکتر مهدی قبیعی حسب، مهندس توتونچی، مهندس سیدمصطفی حسینی و خانم دکتر حلیمه اعتمادی و نیز کلیه پرسنل زحمت‌کش مرکز تکثیر و پرورش ماهیان شهید انصاری رشت که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند کمال تشکر را داریم.

این میزان در تحقیقات (Varsamos) (۲۰۰۲) در آبشش باس دریایی، *Dicentrarchus labrax*، (۲۴۰ گرمی) برابر با ۶۲۵۰ سلول کلراید، در تحقیقات (Van der Heijden) (۱۹۹۷) در آبشش تیلاپای موزامبیک، *Oreochromis mossambicus* (۶۵ گرمی) برابر با ۶۲۳۳ سلول کلراید، در مطالعات (Lin) و همکاران (۲۰۰۳) در آبشش خامه- ماهی، *Chanos chanos*، (۳۱ گرمی) برابر با ۴۰۰ سلول و در تحقیقات (McCormick Pelis) (۲۰۰۱) در آبشش سالمون آتلانتیک، *Salmo salar*، (۲۵ گرمی) ۱۲۰ سلول کلراید شمارش گردید. با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر و در مقایسه با نتایج سایر مطالعات، به نظر می‌رسد که تعداد سلول‌های کلراید در بافت آبششی در گونه‌های مختلف، در ماهی‌های با اندازه‌های مختلف با توجه به میزان فعالیت‌های فیزیولوژیک در سنین و اوزان مختلف متفاوت می‌باشد.

مطالعات مورفولوژیک سلول‌های کلراید بوسیله میکروسکوپ الکترونی، نشان می‌دهد که در اپیتلیوم آبششی گونه‌های مختلف ماهیان سه نوع سلول کلراید وجود دارد: نوع اول (Wavy convex)، نوع دوم (Shallow basin) و نوع سوم (Deep hole) (۱۲، ۲۰). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که سلول‌های کلراید

منابع

۱. پورخواجه، م.، عبدی، ر.، ذوالقرنین، ح.، حسین زاده صحافی، ه.، و مروتی، ح.، ۱۳۹۰. بافت شناسی و مکان یابی ایمینایی سلول‌های یونوسیت در آبشش بچه‌ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*). اقیانوس شناسی. شماره ۲ (۶)، صفحات ۱-۶.
۲. تکه، ش.، ایمانپور، م.، ر.، سوداگر، م.، و شعبانعلی، ع.، ۱۳۸۹. بررسی تغییرات بیوشیمیایی سمن در زمان‌های مهاجرت تولیدمثلی ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* Kamensky 1901. مجله زیست‌شناسی ایران، شماره ۲۳ (۲)، صفحات ۱۹۰-۱۹۶.
۳. خوشنود، ز.، خداپنده، ص.، مسافر، س.، و خوشنود، رضا، ۱۳۸۸. اثرات هورمون کورتیزول بر سلول‌های کلراید آبششی در بچه‌تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*. فصلنامه‌ی پزشکی یاخته. سال یازدهم شماره ۴، صفحات ۴۲۴-۴۳۱.
۴. رستمی یشمن، م.، سلطانی، م.، و ساسانی، ف.، ۱۳۷۹. مطالعه اثرات هیستوپاتولوژی برخی از فلزات سنگین (سولفات مس، سولفات روی، سولفات جیوه، کلرور کادمیوم) بر بافت‌های ماهی کپور معمولی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۵۵ (۴)، صفحات ۱-۳.
۵. شریف پور، ع.، ابطحی، ب.، حیدری جامع بزرگی، ف.، سیف آبادی، ج.، و تقی زاده رحمت آبادی، ز.، ۱۳۹۰. آسیب شناسی

- میزان بازماندگی، غذاگیری و پارامترهای خونی در بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum* Kamensky 1901)، مجله زیست شناسی ایران، شماره ۲۴ (۴)، صفحات ۵۳۹-۵۴۹.
۸. گروبی، ح.، جمیلی، ش.، و رستمی، م.، ۱۳۸۷. اثر سمیت حاد سولفات آلومینیوم بر بافت آبشش ماهی کلمه *Rutilus rutilus*، پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره ۷۹، صفحات ۱۹۳-۱۹۶.
۹. ناجی، ط.، صفائی، ش.، رستمی، م.، و صبرجو، م.، ۱۳۸۶. بررسی اثرات سولفات روی بر بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio*. علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره نهم، شماره ۲، صفحات ۲۹-۳۶.
10. Bertin, L., 1958. Organes de la respiration aquatique, in *Traite de Zoologie*, Vol. XIII, ed. by P. P. Grasse, Masson Publishing. Paris, PP: 1301-1341.
11. Bridges, C. R., Berenbrink, M., Muller, R., and Waser, W., 1998. Physiology and biochemistry of the pseudobranch: An unanswered question? *Comparative Biochemistry and Physiology*, part A., 119 (1), PP: 67-77.
12. Chang, I. C., Lee, T. H., Yang, C. H., Wei, Y. Y., Chou, F. I., and Hwang, P. P., 2001. Morphology and function of gill mitochondria-rich cells in fish acclimated to different environments. *Physiological and Biochemical Zoology*. Vol 74 (1), PP: 111-119.
13. 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 Review*, 85, PP: 97- 177.
14. Glauret, M. A., 1974. *Practical Methods in Electron Microscopy*, Vol. 3, North Holland Publishing, PP: 353.
15. Hirose, S., Kaneko, T., Natio, N., and Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Com. Biochem. Physiol. B*. 136, 593-620.
16. Khodabandeh, S., Kutnik, M., Aujoulat, F., Charmantier, G., and Charmantier-Daures, M., 2005. Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda), immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase. *Cell and Tissue Research*. 319, PP: 153-165.
17. Khodabandeh, S., Khoshnood, Z., and Mosafer, S., 2008. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. *Aquaculture Research*. PP: 1-8.
18. Khoshnood, Z., Khodabandeh, S., Shahryari Moghaddam, M., and Mosafer Khorjestan, S., 2011. Histopathological and Pathomorphological Effects of Mercuric Chloride on the Gills of Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*, Fry. *International Journal of Natural Resources and Marine Sciences*. 1 (1), PP: 23-32.
19. King, J. A. C., 1993. Ultrastructure of the pseudobranch in the euryhaline cyprinodontid fish, *Rivulus marmoratus*, *Journal of Morphology*, 218 (2), PP: 127-142.
20. 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*, Vol 15, PP: 513-523.
21. 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. *Com. Biochem. Physiol., A*, 135, PP: 489- 497.
22. Mortoja, R., and Mortoja-Pierson, M., 1967. *Initiation Aux Techniques de l histologie animale*. Masson et Cie, Paris, PP: 345.
23. Munshi, J. S. D., Roy, P. K., Ghosh, T. K., and Olson, K. R., 1994. Cephalic circulation in the air-breathing snakehead fish, *Channa punctata*, *C. gachua* and *C. marulius* (Ophiocephalidae, Ophiocephaliformes), *Anatomy Research*, 238, PP: 77-91.
24. 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. Gen. Com. Endocrinol. 124, PP: 134-143.
25. Pelster, B., and Randall, D. J., 1998. The physiology of the root effect, in Fish Physiology, ed. by S. F. Perry, and B. L. Tufts, Academic Press, New York. PP: 113-139.
 26. Quinn, M. C. J., Veillette, P. A., and Young, G., 2003. Pseudobranch and gill Na^+ , K^+ -ATPase activity in juvenile Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*: developmental changes and effects of growth hormone, cortisol and seawater transfer, Comparative Biochemistry and Physiology, part A. 135, PP: 249-262.
 27. Roy, P. K., Ghosh, T. K., and Munshi, J. S. D., 1997. The pseudobranch: their structure and function in freshwater teleosts, in Advances in Fish Research, Vol. 2, ed. by B.R. Sing, Narendra Publishing House, Delhi., PP: 81-96,
 28. Seidelin, M., Madsen, S. S., Bryalsen, 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*. Gen. Com. Endocrinol. 113, 331- 342.
 29. 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. J. Exp. Biol., 200, PP: 55-64.
 30. Varsamos, S., 2002. Tolerance Range and Osmoregulation in Hypersaline Conditions in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Mar. Biol. Asso. UK. 82, PP: 1047-1048.
 31. Varsamos, S., Diaz, J. P., Charmantier, G., Flik, G., Blasco, C., and Connes, R., 2002. Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to freshwater, seawater and doubly concentrated seawater. Journal of Experimental Zoology. 293, PP: 12-26.
 32. Waser, W., and Heisler, N., 2004. Oxygen delivery to the fish eye: blood flow in the pseudobranchial artery of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Fish Physiology and Biochemistry, 30 (1), PP: 77-85.
 33. Wong, C., K., C., and Chang, D., K., O., 2001. Effects of Cortisol on chloride cells in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Endocrinol. 168, PP: 185-192.
 34. 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. 17, PP: 34-52.
 35. www.Caspian Environment.org. 2007. Caspian Sea, general background.

Studying the Structure and Ultrastructure and Immunolocalization of the Gill Chloride cells in Caspian Kutum, *Rutilus frisii kutum* Fry

Khoshnood Z.¹, Jamili Sh.¹, Khodabandeh S.², Mashinchian Moradi A.¹ and Motalebi A.A.³

¹ Marine Biology Dept., Faculty of Marine Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

² Marine Biology Dept., Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

³ Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

To investigate the branchial structure of the Caspian Kutum we used releasing fry's (21-33 mg Body Weight). Study of the branchial tissue showed that in these fry's branchial system was made up of 4 gill arch in each side of the head, one pseudobranch in each side of the head and one hemibranch at the posterior wall of the branchial chamber in each side of the head. Each gill arch bears gill filaments and lamella. Pseudobranch tissue is very similar to main gill tissue but it's made up of lamellar shaped structures bound to each other. Immunolocalization of the chloride cells showed that these cells were located on the gill arch, gill filament, at the basis of the lamellae, pseudobranch and the hemibranch of the posterior wall of the gill chamber. Measurements of these cells showed that mean length was $9.70 \pm 0.28 \mu\text{m}$ and mean width was $6.83 \pm 0.24 \mu\text{m}$. Ultrastructural studies showed that the most surface of the gill epithelia was composed of the pavement cells that have apical microridges and between them one can see the chloride cells with apical pit.

Key words: Gill, Chloride Cells, Caspian Kutum, Immunohistochemistry, Electron Microscopy