مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۲، ۱۳۳-۱۲۷
Journal of Veterinary Research. 71,2:127-133, 2016
Original Article

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

هاجر پاپی 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 الکترولیت‌ها 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 میتوکندری 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 ۲۰-۲۵cm به مدت یک هفته در تیمار با شوری‌های (۵ ppt، ۲۰، ۴۰ و ۶۰) که بر اساس مطالعات سایر محققین انتخاب شده بودند قرار داده شدند. مکان یابی آنزیم Na+,K+-ATPase در بافت پوششی آبشش در سلول‌های غنی از میتوکندری آبشش در شوری‌های مختلف محیطی طی روند سازش به روش ایمونوهیستوشیمیایی با استفاده از آنتی بادی IgGα5 انجام گرفت. **نتایج:** مکان یابی NKA نشان داد که سلول‌های غنی از میتوکندری 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 روند افزایشی ولی در تیمار ۲۰ppt روند نزولی را نشان داد. **نتیجه‌گیری نهایی:** بطور کلی، قدرت تحمل و سازش پذیری ماهی صبیتی نسبت به تغییرات شوری محیط، بدلیل ایجاد تغییرات سریع در سلول‌های غنی از میتوکندری جهت تنظیم میزان ورود و خروج آب و الکترولیت‌ها می‌باشد. به این صورت که در شرایط جدید ایجاد شده جهت تطابق سلول، تغییراتی در سطح دهانه‌های رأسی صورت می‌گیرد که میزان آنزیم‌های ناقل الکترولیت‌ها در غشای پایه‌ای - جانبی را تنظیم و همچنین فعالیت میتوکندری‌های سلول‌های غنی از میتوکندری را با شرایط جدید تطبیق می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اکوفیزیولوژی، ایمونوهیستوشیمی، مکان یابی، سلول غنی از میتوکندری

مقدمه

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 کلراید یا سلول‌های یونوسیت که به سلول‌های غنی از میتوکندری نیز معروف می‌باشند ازسلول‌های بسیار مهم در تنظیم اسمزی می‌باشند. میزان این سلول هادر ماهیان دریا زی زیاد بوده دارای شبکه آندوپلاسمی خشن وسیستم توبولی توسعه یافته می‌باشند (۱). این سلول‌ها جهت تأمین انرژی برای انتقال یون، درچین خوردگی‌های غشاء قاعده‌ای- جانبی دارای آنزیم Na+, K+-ATPase می‌باشند (۳). سطح رأسی سلول‌های غنی از میتوکندری بسیار انعطاف پذیر و دارای یک فرورفتگی می‌باشد (۱۶،۲۰). یکی از ابزارهای مهم در تشخیص سلول‌های غنی از میتوکندری 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 Na+, K+-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

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱۵-۳۵۳۳۳۲۲ نمابر: ۰۶۱۵-۳۵۳۳۳۲۲ Email: amovahedinia@yahoo.com

اشـغال شده توسـط میتوکندری در اپیتلیوم آبشش و کلیه بادکنک ماهی (Sphoeroides testudineus) بعد از سازگاری با محیط ایزواسموتیک صورت گرفت مشخص شد که، ناحیه اشغال شده توسط میتوکندری‌ها در نمونه‌های سـازگار شده با محیط ایزاسموتیک (۱۰٪) نسبت به نمونه‌های گروه کنترل (۳۰٪) افزایش معنی‌داری داشـته اسـت (۸). براساس مطالعه Chen و همکاران در سـال ۲۰۰۴ بر روی آبشش خامه‌ماهی (Chanos chanos) سازگارشده با آب شیرین و آب دریا، یونوسیت‌ها روی اپی‌تلیوم آبشـش در هر دو گروه فراوان بوده بطوریکه این سـلول‌ها به ندرت روی اپی‌تلیوم لاملایی ماهیان سـازگار با آب دریا مشـاهده شـد درحالیکه در ماهیان سازگارشـده به آب شیرین عموماً یافت می‌شود (۲). Varsamos و همکاران در سـال ۲۰۰۵ بیان داشـتند، آنزیم Na+/K+ATPase که در غشـای تمامی سـلول‌های 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 شـوری‌های پایین‌تر از خلیج فارس که در این مورد تنظیم اسـمزی جانـور در محیط با شـوری‌های متفاوت نقش مهمی را بر عهـده دارد و از آنجاییکه سـلول‌های کلراید موجود در اپی تلیوم آبشـش جایگاه و نقش مهمی برای جذب و دفع یون در آب دریا و آب شیرین می‌باشند و مطالعات روی ماهیان نشـان داده که چگونه سـلول‌های کلرایـد در زمان مهاجرت ماهی در شـوری‌های مختلف آب دریا و یـا بالعکس تغییر می‌یابد. بدلیل اینکـه اصلی ترین عامل موفقیت این جانداران تسـلط بر محیط متفاوت دریاها یعنی قدرت تنظیم یونی و حفظ هموسـتاز بدن که این عامل یکی از مهمترین و جذاب‌ترین تحقیقات برای دانشـمندان به شمار می‌رود و به خصوص آنکه مطالعه اخیر بـر روی یکی از ماهی‌های بومی خلیج فارس که دارای ارزش، اهمیت غذایی و اقتصادی بسـیار فراوان برای سـاکنین مناطق ساحلی جنوب می‌باشد پژوهش اخیر بروش ایمونوهیستوشیمی 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

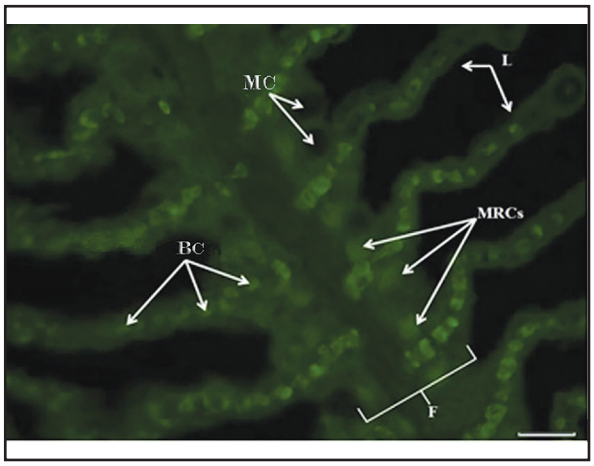
بـرای انجام این پروژه ۱۸۰ قطعه ماهی صبیتـی ۳ ماهه در محدوده وزنی ۱۵۰g و طول کل حدود ۲۵cm-۲۰ در ایسـتگاه تحقیقاتی بندر امام خمینی (ره) استفاده شدند. ماهی‌ها به صورت تصادفی در ۴ تیمار و با ۳ تکرار برای هر تیمـار در تانک‌های ۳۰۰l محتوی آب دریای فیلتر و ضد عفونی شده با اشعه ماورای بنفش به مدت یک هفته (۲۲) قرار داده شدند. شرایط محیطی شامل دما و نور در طول پروژه برای تمامی تانک‌ها یکنواخت بوده ودر طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیک و شیمیایی آب از قبیل شوری، دما، pH و اکسیژن محلول به ترتیب با استفاده از رفرکتومتر نوری (Horiba U-۱۰، ژاپـن)، ترمومتر دیجیتالـی (Horiba U-۱۰، ژاپن)، دسـتگاه قابل حمل سـنجش pH مدل (Ebro.PHT-۳۱۴۰) و دسـتگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن مدل (TECPEL DO-۱۶۰۹) 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 شـاهد) و ۶۰ ppt در نظر گرفته و برای هر شـوری سـه تانک تکرار در نظر گرفته شـد. برای این منظور نمونه‌برداری از آبشـش ماهیان در۳ مرحلـه در روز ۱، روز ۲ و روز ۷ بصـورت همزمـان و ۱ ماهـی از هر تیمار (۳ماهی از هر تیمار) در هر بار انجام و در محلول بوئن فیکس شـدند (۴). برای مطالعه‌ایمنوهیستوشـیمی، لام‌ها بعد از آبگیری در الکل اتانول خالص، در محلول فسـفات بافر سالین (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 ۱۰۰µl از آنتی کور IgGα۵ رقیق شده در PBS اضافه شـده و به مدت ۲ سـاعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس ۱۰۰µl از آنتی کور FITC روی هر لام اضافه شـد و به مدت یک سـاعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شدند. کلیه لام‌ها بعد از قرار دادن لامل روی آنها در جعبه‌های مخصوص چیده شـده و برای حفظ خواص فلوئورسانسی در جای تاریک نگهداری شدند. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلوئورسانس (Lambda-۱ LeitzDiaplan Coupled to a Ploemopak Lamp, Japan) بـا فیلترهـای ۴۹۰nm-۴۵۰ مشـاهده و سـلول‌های کلراید موجود در پنج میدان دید برای هر نمونه شـمارش 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-WayA NOVA) و پس آزمون توکی توسط نرم افزار SPSS ۱۱/۵ انجـام گردید. درجه معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مورد پذیرش قرار گرفتـه و از آنها عکس برداری شـد (۱۰،۱۱،۱۳). کلیه عملیات مربوط به ایمونوهیستوشیمی 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 ۴۰ppt قابل تشخیص بوده اند (تصویر۱-۱). پس از در معرض قرار دادن ماهی‌ها با شـوری‌های مختلف و بررسـی 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

جدول۱. 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

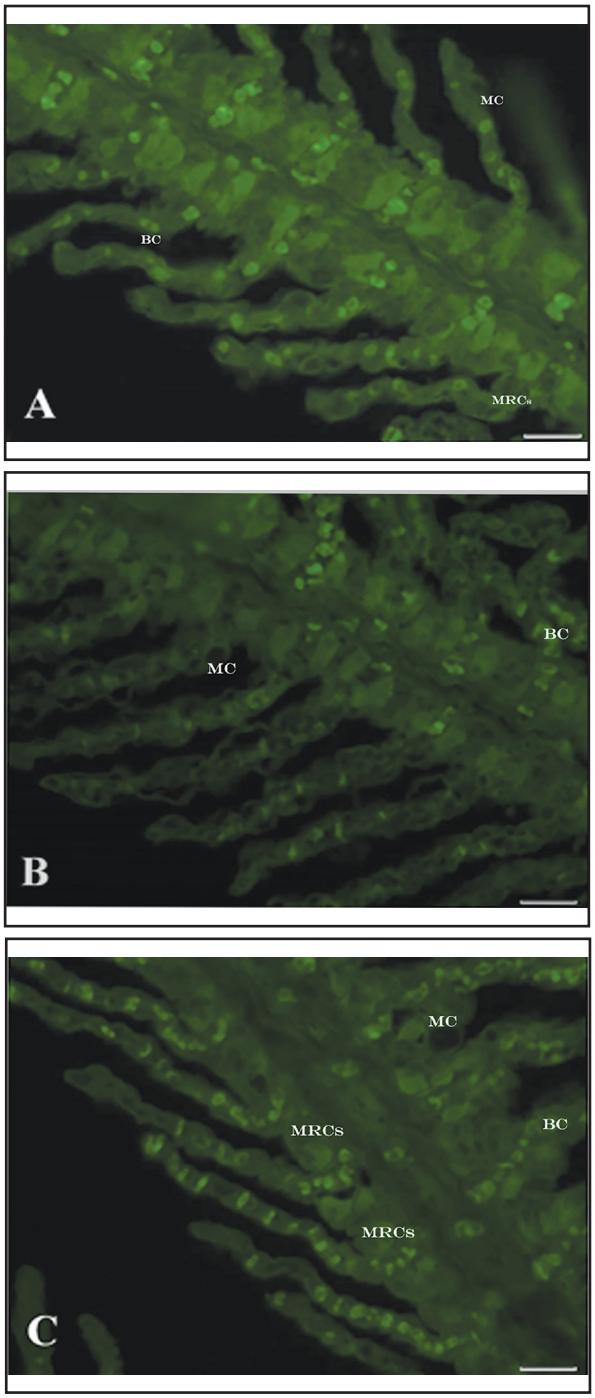


تصویر ۱. مکان یابی آنزیمNa+, K+- ATPase در برش طولی رشته‌های آبششی ماهی صبیتی در شوری ۴۰ ppt. فیلامنت (F)، تیغه‌ها و لاملاهای آبششی (L) در دو سمت رشته به خوبی قابل رویت می‌باشند. سلول‌های غنی از میتوکندری (MRCs) در ناحیه بین تیغه‌ای قرار داشته سلول‌های خونی(BC) و موکوسی (MC) نیز قابل تشخیص می‌باشند.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

ملاحظه‌ای مشاهده گردید بطوریکه بر اساس جدول ۱-۱ بیشترین تعداد این سلول‌ها در شوری ۶۰ppt 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 شوری۵ppt 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، مکان‌یابی NKA نشان داد که سلول‌های غنی از میتوکندری به تعداد زیاد در اپیتلیوم فیلامنتی و به ندرت در اپیتلیوم لاملایی در این شوری دیده شدند، که سلول‌های غنی از میتوکندری معمولاً روی لبه آوران رشته‌ها در قسمت رأسی لاملا، پایه لاملا و بین لاملا حضور داشتند. در شوری ۲۰ppt شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری نسبت به بقیه شوری‌ها کمتر شده بود. این کاهش شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری در این شوری محدود به اپیتلیوم فیلامنتی و به مقدار اندکی اپیتلیوم لاملایی بود (تصویر ۲-B). در شوری ۶۰ppt نسبت به مابقی شوری ها، تغییرات صعودی بود به نحوی که بیشترین شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری در پایان دوره در این شوری بود. که این افزایش شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری در شوری ۶۰ppt مربوط به اپیتلیوم فیلامنتی و لاملایی بود (تصویر ۲-C).

بحث

استفاده از آنتی بادی IgGα۵ جهت مکان یابی آنزیم Na+, K+-ATPase و در واقع سلول‌های غنی از میتوکندری در حشرات آبزی، سخت پوستان و ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، باس دریایی، گوپی، سالمون چام، خامه ماهی از موفق ترین روش ذکر گردیده است. براساس این تحقیقات، سلول‌های غنی از میتوکندری اپیتلیوم لاملایی 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 میتوکندری بر روی اپیتلیوم لاملاها گردیده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های غنی از میتوکندری ماهی صبیتی در اپیتلیوم لاملایی در تنظیم اسمزی هیپوتونیک نقش دارند. چنین یافته‌ای را Varsamos و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعه مکان یابی سلول‌های غنی از میتوکندری در باس دریایی (*Dicentrarchus Labrax*) آداپته شده به آب با شوری دو برابر آب دریا و آب شیرین نیز به دست آورند. مطالعات انجام شده بر روی دو گونه *Chionodracohamatus* و *Trematomusbernacchii* سلول‌های غنی از میتوکندری لاملایی 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 میتوکندری بر اپیتلیوم لاملاها در محیط با شوری ۵ppt فعال می‌باشند و این مسئله، بر خلاف مطالعاتی می‌باشند که نقش سلول‌های غنی از میتوکندری اپیتلیوم لاملاها را تنها در محیط‌های هیپرتونیک می‌دانند (۱۶). بررسی‌ها روی ماهیان مختلف بیانگر این است که سلول‌های غنی از میتوکندری 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 میتوکندری 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 میتوکندری 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 گوپی نشان داده است که در دوره سازگاری این ماهی به آب دریا و آب شیرین، نه تنها تعداد و اندازه سلول‌های غنی از میتوکندری 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 میتوکندری روی تیغه‌های آبششی نیز گزارش شده است (۱۷). در پژوهشی که توسط Khodabandeh و همکاران در سال ۲۰۰۹



تصویر ۲. مکان یابی آنزیم Na^+, K^+- ATPase در برش طولی رشته‌های آبششی ماهی صبیتی طی سازش با شوری‌های مختلف محیطی که شامل ۵ ppt (A)، ۲۰ppt (B) و ۶۰ppt (C). مقیاس=۴۰µm.

بروی ماهی (*Liza aurata*) Grey Mullet Golden با آب شیرین و شوری ۱۲ppt، ۳۶ و ۴۶ انجام شد گزارش گردید که سلول‌های غنی از میتوکندری روی اپیتلیوم فیلامنتی و روی لاملا مشاهده شده اند. در انتقال ماهی به شوری ۱۲ppt شدت واکنش پذیری سلول‌های NKA در اپیتلیوم فیلامنت کاهش یافت و این سلول‌ها در اپیتلیوم لاملاها مشاهده نشدند. در شوری‌های ۳۶ppt و ۴۶ شدت واکنش پذیری در اپیتلیوم فیلامنتی افزایش یافته که این واکنش پذیری در اپیتلیوم لاملایی به مقدار کم مشاهده شد. تحقیق مشابه‌ای توسط Zydlewski و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام پذیرفته و گزارش نمودند که شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری در اپیتلیوم لاملایی ماهی شاد امریکایی (Alosasa pidissimas) سازگار شده با آب شیرین را خیلی بیشتر از همین ماهی در سازگاری با شوری ۳۱ppt 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 (۷). در ماهی صبیتی در شوری ۶۰ppt نسبت به سایر شوری ها، شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری بیشتر بود. این افزایش شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری در شوری ۶۰ppt محدود به اپیتلیوم فیلامنتی بود. این چنین نتیجه‌ای را Ouattara و همکاران در سال ۲۰۰۹ با مطالعه مرفولوژی و وظایف سلول‌های غنی از میتوکندری در تیلاپیا بعد از انتقال به آب شیرین، شوری ۳۵ppt، شوری ۷۰ppt و شوری ۹۰ppt مشاهده و گزارش کردند که سلول‌های غنی از میتوکندری در آب شیرین فقط در پایه فیلامنت وجود داشته ولی در شوری‌های ۳۵ppt، 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 در مطالعه بر روی ماهی تیلاپیای موزامبیک گزارش کردند که شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری موقع انتقال ماهی از آب شیرین به شوری‌های ۳۰ppt و ۶۰ 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 Na+, K+–ATPase می‌باشد (۲۱). اکثر ماهی‌ها پاسخ‌های مختلفی از فعالیت Na+, K+–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 ۲۰ppt شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری نسبت به بقیه شوری‌ها کمتر شده بود. این کاهش شدت واکنش پذیری سلول‌های غنی از میتوکندری 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 میتوکندری در مواجهه با شوری ۲۰ppt کاهش یافت که با نتایج Lee و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطابقت دارد (۴،۱۴). این محققین بر این باورند که به خاطر کاهش اختلاف در غلظت یون‌ها بین محیط خارجی و مایعات بدن ماهی، در محیط ۲۰ppt، نیاز به دفع فعال یون‌های اضافی، کاهش

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 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.

References

1. Baldisserotto, B., Mancera, J.M., Kapooor, 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, Ischnurae legans, and Anisoptera, Libellula lydia, Larvae (Odonata): Activity and Immmunocytochemical 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 differend 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 Differend 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 fuguTakifuguru bripes 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 osmoregulationin 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) Cholride 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 sapidissimo. 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, Khoramshahr- 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 IgGα5 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, immunohistochemistrya, immunolocalization, mitochondria rich cell

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean±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 µm.

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=40µm.

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