مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۰، ٤١٤-٤٠٧

مکان‌یابی و بررسی اثر محیط‌های هیپر و هیپواسموتیک بر نحوه پراکندگی آنزیم Na^+, K^+- ATPase در توبول‌های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی *(Epinephelus coioides)*

احسان رومیانی[۱]، رحیم عبدی[۲*]، حسین ذوالقرنین[۲]، احمد سواری[۲]، حسن مروتی[۳]

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم جانوری گرایش بافت شناسی آبزیان و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد
۲- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: abdir@kmsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۲۲

چکیده

هدف: بافت‌شناسی نفرون‌های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی (Epinephelus coioides) و مکان‌یابی آنزیم Na^+/ K^+- ATPase در خلال تنظیم اسمزی و تطابق با محیط‌های هیپو و هایپراسموتیک (۶۰ ppt و ۱۰) با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی.

مواد و روش‌ها: به منظور بافت‌شناسی نفرون‌های کلیوی از رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین استفاده شد. مکان‌یابی ایمن‌یابی آنزیم Na^+, K^+- ATPase نیز با استفاده از آنتی بادی‌های اولیه ($IgG\underline{\alpha_5}$) و ثانویه FITC انجام شد.

نتایج: مطالعات بافت‌شناسی نشان داد نفرون‌های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی شامل جسمک کلیوی، قطعه گردنی، توبول پروکسیمال اولیه و ثانویه، توبول دیستال و جمع کننده می باشند. نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نیز نشان داد که در تیمار کنترل آنزیم مذکور در سمت قاعده‌ای- جانبی سلول‌های اپیتلیال توبول‌های کلیوی بچه ماهی هامور حضور داشته اما در گلومرول‌ها حضور ندارد. در محیط‌های هیپواسموتیک و هیپراسموتیک نیز به مانند تیمار کنترل آنزیم در سمت قاعده‌ای- جانبی سلول‌های اپیتلیال توبول‌ها حضور دارد اما در ساختار گلومرول‌ها حضور ندارد.

نتیجه گیری: با توجه به اطلاعات بدست آمده در این تحقیق می‌توان به این نتیجه رسید که ساختار نفرون‌ها در کلیه ماهی هامور معمولی شبیه ساختار آن در سایر گونه‌های ماهیان یوری هالین می باشد. همچنین، حضور آنزیم در سمت قاعده‌ای- جانبی سلول‌های اپیتلیال کلیوی نشان‌دهنده حضور فعال این آنزیم در فرایند تنظیم اسمزی می‌باشد.

واژگان کلیدی: هامور معمولی، نفرون‌های کلیوی، Na^+/ K^+- ATPase، مکان یابی ایمنیایی، تنظیم اسمزی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ماهی هامور معمولی از خانواده Serranidae، یک گونه یوری هالین می‌باشد که بیشتر در مناطق استوایی و نیمه استوایی زندگی می‌کند (۱). هامور ماهیان در اکثر کشورهای جنوب شرق آسیا جز ماهیان مهم پرورشی محسوب می‌شوند و به دلیل داشتن گوشت لذیذ و غنی، دارای ارزش اقتصادی بالایی هستند. هامور معمولی ساکن آب دریا می باشد، بنابراین نسبت به محیط خود هیپواسمتیک است. در این شرایط مکانیسم‌های هایپواسمورگولاتوری (Hypoosmoregulatory) روش‌های جبرانی برای جبران از دست رفتن آب و تهاجم یون‌ها می‌باشند. قابلیت تنظیم اسمزی و یونی در جانوران آبزی آن‌ها را برای تطابق با شرایط مختلف محیط از جمله تغییرات شوری توانمند ساخته است (۲). در این شرایط بواسطه نوشیدن آب از دهیدراته شدن شدید جلوگیری می‌شود و آب توسط روده جذب شده و یون های اضافی هم توسط آبشش‌ها و کلیه ها دفع می شوند (۳و۴). حفظ تعادل پایدار محیط درونی برای زندگی در محیط‌های گوناگون توسط مهره داران ضروری به نظر می‌رسد. در پاسخ به این تغییر شرایط محیطی اپی تلیوم انتقال دهنده نقش مهمی را در انتقال یون‌ها ایفا می‌کند. تنظیم اسمزی در تلئوست‌ها بواسطه یک سری از بافت‌ها و اندام‌ها شامل آبشش، کلیه و روده انجام می‌شود (۵). کلیه یک نقش مهم در تنظیم اسمزی هر دو گروه ماهیان آب شور و شیرین ایفا می‌کند که البته این ایفای نقش در این دو محیط دارای تفاوت‌هایی نیز می‌باشد (۶).

کلیه نقش خود را در تنظیم اسمزی ماهیان استخوانی یوری هالین از طریق تغییر در میزان ادرار و ایجاد تعادل و توازن بین ترشح و بازجذب یون با توجه به شوری و اسمولالیته محیط آبی ایفا می کند (۷). در فرایند تنظیم اسمزی آنزیم‌های زیادی درگیر هستند که یکی از مهم‌ترین این آنزیم‌ها Na^+/ K^+- ATPase می‌باشد که یک آنزیم عمومی غشا پلاسمایی می‌باشد که به طور فعال سدیم را به خارج و پتاسیم را به داخل سلول‌های جانوری انتقال می دهد (۸). این آنزیم یک ATPase تیپ P می‌باشد و از دو زیر واحد $(\alpha)_2$ و $(\beta)_2$ تشکیل شده است. α زیر واحد کاتالیتیک آنزیم بوده و وزن مولکولی آن در حدود ۱۰۰ کیلو دالتون می‌باشد. زیر واحد β کوچکتر و گلیکوزیله می‌باشد و وزن مولکولی‌ای در حدود ۵۵ کیلو دالتون دارد (۹). مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نشان داده‌اند که این آنزیم اساسا در سلول‌های غنی از میتوکندری اپیتلیوم آبشش (۱۰) و اپی‌تلیوم توبول‌های کلیوی (۱۱) ماهیان استخوانی یوری هالین حضور دارد. هامور معمولی از ماهیان اقتصادی خلیج فارس می‌باشد که در سایت‌های تکثیر و پرورش جنوب کشور تکثیر می‌یابد. این ماهی همچنین دارای میزان صید بالایی در سواحل خلیج فارس می باشد. نظر به تولید و رهاسازی این ماهی در آب‌های ساحلی و تغییرات شوری این آب‌ها، در این تحقیق سعی شده است تا علاوه بر بافت شناسی توبول های کلیوی به عنوان اندام مهم در تنظیم اسمزی، آنزیم Na^+/ K^+- ATPase که از مهم ترین آنزیم های درگیر در روند تنظیم اسمزی می‌باشد و بخش عمده‌ای از انرژی مصرفی در تنظیم اسمزی را به خود اختصاص می‌دهد، با استفاده از روش مکان یابی ایمنیایی این آنزیم در طی روند سازگاری این ماهی با شوری های مختلف، مکان‌یابی شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مربوط به این تحقیق از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) وابسته به پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور تهیه شدند. هوا بین ۲۲- ۲۰ درجه سانتی گراد حفظ، دوره فوتوپریود ۱۲ ساعت، pH نیز بین ۷/۸-۷/۷ حفظ شد و تغذیه ماهیان توسط غذای ماهی Biomar (China) انجام شد. به منظور انجام آزمایش بچه ماهیان۰/۳± ۴ گرمی هامور معمولی پس از یک هفته آداپتاسیون، به محیط های هیپواسموتیک(آب با شوری پایین)((10 ppt) و هیپراسموتیک(آب با شوری بالا) (60 ppt) انتقال داده شدند. طول دوره این آزمایش ۴ هفته بود که پس از اتمام آن به طور تصادفی از ماهیان نمونه برداری شد و ماهیان توسط محلول گل میخک بی‌هوش شدند. سپس، سر و قطعه دمی جدا و دستگاه گوارش خارج گردید و نمونه ها به منظور تثبیت به محلول بوئن (متشکل از اسیدپیکریک اشباع، فرمالین تجاری و اسید استیک گلاسیال) منتقل و به آزمایشگاه بافت شناسی و جنین شناسی آبزیان دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انتقال داده شدند. نمونه‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از بوئن خارج و برای از بین بردن بقایای رنگ زرد ماده تثبیت کننده چندین بار در الکل ۷۰درصد شستشو و برای انجام مراحل بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی، نمونه ها با استفاده از سری افزایشی اتانول آب گیری و سپس پارافینه شدند (۱۲). در مرحله بعد، از قالب‌ها برش‌های سریالی از بخش دفعی توبول‌های کلیوی به ضخامت ۵

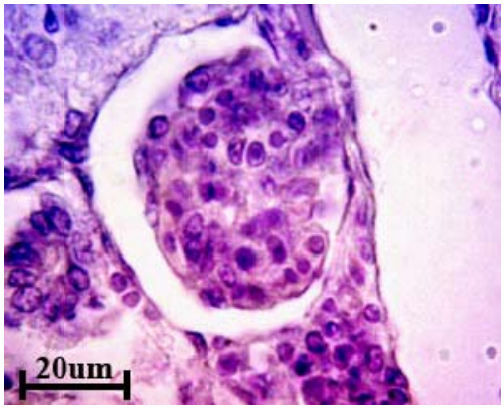
www.SID.ir
Archive of SID

میکرون با استفاده از میکروتوم نیمه دیجیتال LEICA مدل RM2245 ساخت کشور آلمان تهیه گردید. برای مطالعات بافت‌شناسی لام‌ها به وسیله هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند. برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی که در آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس واقع در شهرستان نور انجام شد. برش‌ها پس از تهیه بر روی لام‌هایی با پوشش Poly- l- Lysin قرار داده شدند و مکان یابی سلول‌های غنی از میتوکندری و آنزیم Na^+/K^+- ATPase بر طبق روش (۲،۱۲، ۱۳ و ۱۴) انجام شد. بدین صورت که، لام‌ها بعد از پارافین زدایی و آبدهی در درجات صعودی اتانول در محلول PBS (Phosphate Buffer Saline) شستشو و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب قرار داده شدند. سپس روی هر لام ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی اولیه $IgG\alpha_5$ Monoclonal Antibody Raised Against Mouse) the α-subunit of the Chicken Na^+/K^+-ATPase; Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) رقیق شده در PBS اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی ثانویه FITC Isothiocyanate; Monoclonal Mouse Fluorescein) (Anti-florescein Antibody; Merck Germany روی هر لام اضافه و به مدت یک ساعت در محیط کاملا تاریک نگه داشته شدند. سپس لام ها توسط PBS شستشو و با استفاده از مایع مونتاژ، مونتاژ شدند. جهت پی بردن به درستی کارکرد این آنتی بادی، به تعدادی از لام‌ها آنتی بادی اولیه اضافه نشد ولی آنتی بادی ثانویه اضافه گردید.

در نهایت مکان یابی ایمنیایی Na^+/K^+-ATPase با استفاده از میکروسکوپ نوری فلوئورسانس انجام شد. برای این منظور، از لام‌ها توسط دوربین دیجیتال Olympus متصل به میکروسکوپ فلوئورسنت (Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak 1- Lambda Lamp) با فیلترهای اختصاصی 490nm -450 عکس برداری صورت گرفت.

نتایج

نتایج مطالعات بافت شناسی نشان داد که در *E. coioides* نفرون‌ها از جسمک کلیوی شامل گلومرول و کپسول بومن (شکل ۱)، قطعه گردنی، توبول‌های پروکسیمال، دیستال و جمع کننده تشکیل شده‌اند. قطعه گردنی از سلول‌های مکعبی کوتاه با هسته‌های قاعده‌ای، قطر لومن باریک تر نسبت به سایر قطعات و بدون حاشیه مسواکی تشکیل شده بود. همچنین این قطعه فاقد حاشیه مسواکی بود اما تعدادی میکروویلی کوتاه بر روی سطح لومینال سلول‌های اپیتلیال آن وجود داشت. توبول پروکسیمال I دارای سلول‌های مکعبی با هسته قاعده‌ای و میکروویلی‌هایی در رأس (حاشیه مسواکی) بود که به داخل لومن کشیده شده بودند.



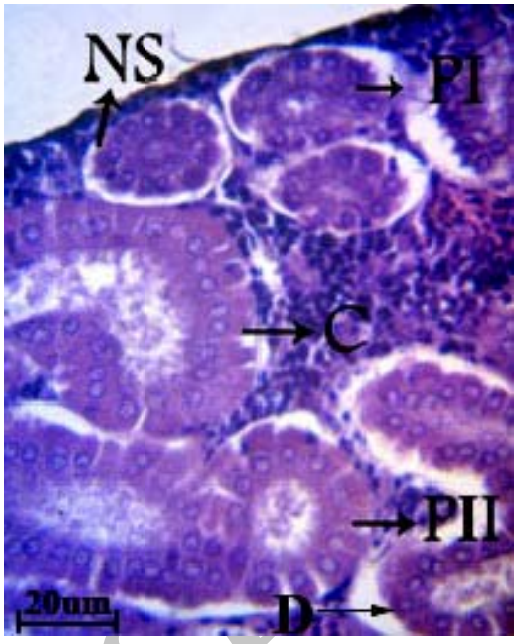
شکل ۱: جسمک کلیوی در ساختار نفرون های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی E. coioides فیکساتیو بوئن، رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین.

قطعه پروکسیمال II نیز دارای سلول‌های مکعبی بود اما در این قطعه سلول‌های اپیتلیال نسبت به قطعه I بلندتر بوده و هسته آن‌ها نیز تاحدودی به سمت مرکز سلول متمایل شده بود. همین طور در این قطعه از تراکم میکروویلی‌های حاشیه مسواکی کاسته شده بود (شکل ۲ و ۳). سلول‌های اپیتلیال توبول‌های دیستال مکعبی و بلند تر از قطعات قبلی بوده و هسته آنها نیز تقریبا گرد و در وسط سلول مشاهده شد. از این قطعه به بعد هیچ گونه میکروویلی‌ای مشاهده نشد (شکل ۲). توبول‌های جمع کننده بواسطه داشتن سلول‌های مکعبی بلند، فاقد حاشیه مسواکی و هسته‌های بیضوی تا گرد و تقریبا میانی تشخیص داده شدند (شکل ۲).

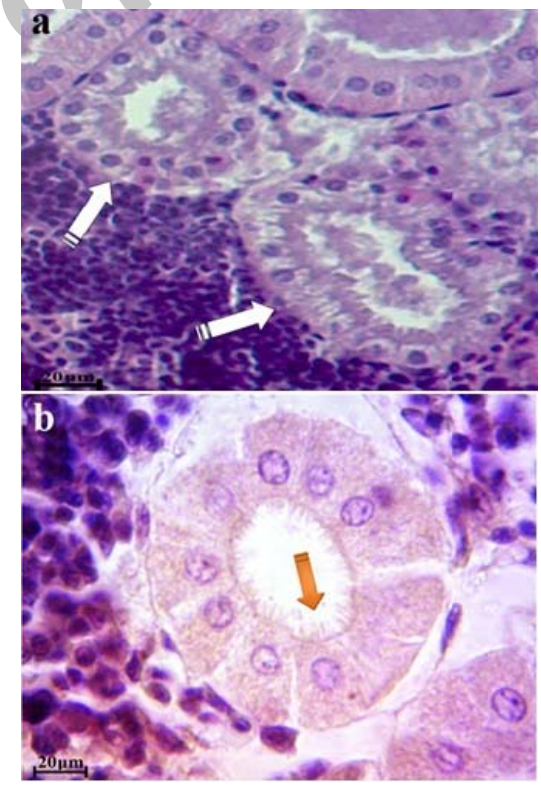
مطالعه ایمونوفلئورسانس لام‌ها نشان داد که آنزیم Na^+/K^+-ATPase در سمت قاعده‌ای- جانبی سلول‌های غنی از میتوکندری توبول‌های کلیوی (پروکسیمال، دیستال و جمع کننده) حضور داشتند، اما در ساختار گلومرول‌ها حضور آنزیم تشخیص داده نشد (شکل ۴). در تیمارهای هیپواسموتیک و هیپراسموتیک نیز مانند تیمار شاهد، حضور آنزیم بواسطه تولید نور فلوئورسانس در سمت قاعده‌ای- جانبی سلول‌های غنی از میتوکندری در توبول‌های پروکسیمال، دیستال و جمع کننده تشخیص داده شد. اما، در گلومرول‌ها هیچ گونه ایمونوفلوئورسانسی مشاهده نشد (شکل‌های ۵ و ۶).

Archive of SID

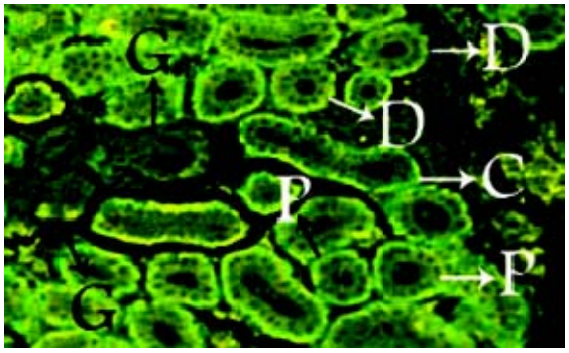
www.SID.ir



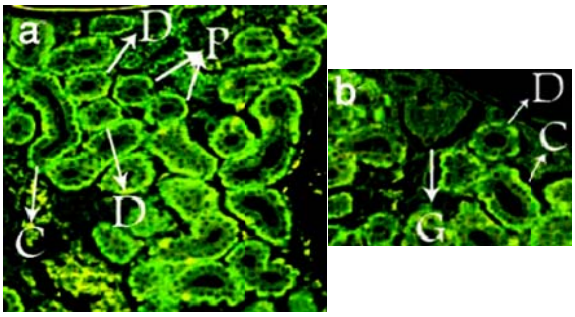
شکل ۲: توبول های مختلف در ساختار نفرون های کلیوی *E. coioides* فیکساتیو بوئن، رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین. NS (Neck Segment): قطعه گردنی، PI: توبول پروکسیمال اولیه، PII: توبول پروکسیمال ثانویه، D: توبول دیستال و C: توبول جمع کننده.



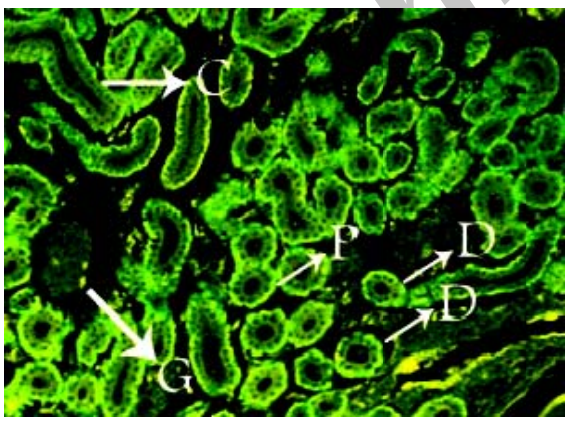
شکل ۳: a و b: توبول های پروکسیمال اولیه و ثانویه در ساختار نفرون های کلیوی *E. coioides* فیکساتیو بوئن، رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین. پیکان منقطع سفید (a)، نشان دهنده توبول پروکسیمال اولیه به همراه حاشیه مسواکی متراکم آن؛ پیکان منقطع نارنجی (b)، توبول پروکسیمال ثانویه به همراه حاشیه مسواکی کم تراکم آن.



شکل ۴: مکان یابی آنزیم Na+/ K+- ATPase در برش عرضی نفرون‌های کلیوی *E. coioides* در تیمار کنترل. P: توبول پروکسیمال، D: توبول دیستال، C: توبول جمع کننده و G: گلومرول.



شکل ۵: a و b: مکان یابی آنزیم Na+/ K+- ATPase در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در محیط هیپواسموتیک (آب با شوری پایین). P: توبول پروکسیمال، D: توبول دیستال، C: توبول جمع کننده و G: گلومرول.



شکل ۶: مکان یابی آنزیم Na+/ K+- ATPase در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در محیط هیپراسموتیک (آب با شوری بالا). P: توبول پروکسیمال، D: توبول دیستال، C: توبول جمع کننده و G: گلومرول.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

اوگاوا (۱۵) ساختار کلیه ماهیان استخوانی را به پنج دسته تقسیم بندی کرده است. بر اساس این دسته بندی، کلیه ماهی هامور معمولی شبیه اکثر ماهیان استخوانی دریایی، خصوصیات مورفولوژیکی شبیه نوع سوم این دسته بندی را نشان می دهد. بنابراین، کلیه ماهی هامور دارای ساختمانی شبیه دیگر ماهیان یورهالین می‌باشد (۱۶ و ۱۷)، یعنی دارای بخش‌های گلومرول، توبول پروکسیمال، توبول دیستال و توبول جمع کننده در ساختار نفرون‌هایش است. مطالعات بافت شناسی بخش دفعی کلیه بچه ماهی هامور نشان داد که نفرون ها از گلومرول، توبول‌های پروکسیمال، توبول های دیستال و توبول های جمع کننده تشکیل یافته اند. همانطور که در بالا گفته شد در ساختار نفرون‌های کلیوی بچه ماهی هامور توبول‌های دیستال تشخیص داده شدند که با بیان هیچمن و همکاران (۱۸) که اظهار داشتند ماهیان استخوانی دریایی فاقد توبول دیستال‌اند (۱۸) مطابقت ندارد. توبول‌های پروکسیمال دارای سلول‌های مکعبی و هسته قاعده‌ای بوده و بواسطه داشتن حاشیه مسواکی از توبول‌های دیستال و توبول‌های جمع کننده قابل تمیز اند که این نتایج با نتایج گزارش شده توسط تنگ و همکاران (۱۹) همخوانی دارد. خود توبول‌های پروکسیمال از قطعات I و II تشکیل شده که تعداد میکروویلی در آنها از قطعه I به سمت قطعه II کاهش نشان می‌دهد و از قطعه II به بعد، یعنی در توبول‌های دیستال و جمع کننده هیچ گونه میکروویلی مشاهده نمی‌شود. ویژگی توبول‌های دیستال داشتن هسته‌های تقریبا کروی و مرکزی می‌باشد. توبول‌های جمع کننده نیز مانند توبول‌های دیستال فاقد میکروویلی در لومن خود بوده و بواسطه داشتن سلول‌های مکعبی بلند، هسته‌های بیضوی تا گرد و تقریبا میانی تشخیص داده می‌شوند. نتایج مشابهی در مورد دیگر گونه‌ها از جمله در مطالعه‌ی چرمی (۲۰) بر روی دو گونه‌ی *Hosu hosu* و *Acipenser persicus* و همچنین خدابنده و همکاران (۱۲) بر روی گونه‌ی *Acipenser persicus* گزارش شده است که نشان دهنده ساختار تقریبا مشابه نفرون‌های کلیوی در ماهیان یوری هالین بوده و نیز تایید کننده نتیجه مطالعه حاضر مبنی بر حضور توبول‌های دیستال در ساختار نفرون‌های کلیوی می‌باشد.

با توجه به اینکه یک عملکرد مهم سیستم ادراری تنظیم یونی می‌باشد، اما مکان‌یابی سلول های غنی از Na^+/K^+-ATPase نسبت به آبشش کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴). نتایج این مطالعه روی کلیه بچه ماهی هامور نشان داد که آنتی بادی ($IgG\alpha_5$) در واکنش با آنزیم Na^+/K^+-ATPase ایمونوفلوئورسانس قابل ملاحظه‌ای تولید می کند. بنابراین، این آنتی بادی قادر به شناسایی محل حضور سلول‌های غنی از میتوکندری است. نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نشان داد که آنزیم فوق در غشاء قاعده‌ای- جانبی توبول های پروکسیمال، توبول‌های دیستال و توبول‌های جمع کننده، در همه شوری ها حضور دارد، اما در گلومرول‌ها وجود ندارد. به عبارت دیگر، آنزیم Na^+/K^+-ATPase حاضر در غشاء قاعده‌ای- جانبی سلول‌های غنی از میتوکندری توبول‌ها با آنتی بادی ($IgG\alpha_5$) واکنش ایمنیایی داده و تولید فلوئورسانس می‌نماید. نتایج مشابهی در مورد دیگر گونه‌های ماهیان استخوانی، از جمله در مطالعه تنگ و همکاران (۱۹) بر روی خامه ماهی *(Chanos chanos)* و لین و همکاران (۸) در مطالعه روی بادکنک ماهی خال سبز *(Tetraodon nigroviridis)* گزارش شده است. شدت فلوئورسانس مشاهده شده در این مطالعه که بواسطه حضور حضور آنزیم Na^+/K^+-ATPase ایجاد شده است، می‌تواند نشان از حضور فعال این آنزیم در توبول‌های کلیوی به جهت انجام وظیفه تنظیم اسمزی آنها باشد. همین طور تراکم فلوئورسانس در غشا قاعده‌ای- جانبی لوله ها، می‌تواند بر نقش سلول‌های غنی از میتوکندری در تبادلات یونی و نیز توانایی هیپراسمولاریتی در ماهی هامور معمولی دلالت کند. همین طور نبل و همکاران (۱۴) با بررسی آبشش و دستگاه ادراری بچه ماهیان باس دریایی *(Dicentrarchus labrax)* و توانایی تطابق آنها با محیط آب شیرین، مشاهده کردند که آنزیم Na^+/K^+- ATPase در همه توبول‌ها و مجاری ادراری، و در سمت قاعده‌ای جانبی سلول‌های اپیتلیوم آنها حضور دارد.

خدابنده و همکاران (۱۲) در مطالعه ای به منظور مکان‌یابی سلول‌های غنی از میتوکندری در آبشش و دستگاه ادراری تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) مشاهده کردند که این آنزیم در توبول‌های دیستال و جمع کننده حضور داشته که توسط تولید نور فلوئورسانس قابل مشاهده است. بنا به گفته‌ی نیشی مورا و همکاران (۲۱) در آب شیرین به دلیل کم بودن یون‌های موجود در آب و دفع مقادیر بالای آب، لازم است سلول‌های غنی از میتوکندری موجود در توبول‌های کلیوی به ویژه توبول‌های دیستال و جمع کننده با افزایش میزان باز جذب یونی از مایع فیلترا و دفع آب اضافی بدن تعادل یون و آب را حفظ کند (۲۱). اما در گلومرول و توبول پروکسیمال هیچ گونه فلوئورسانسی را مشاهده نکردند که این نشانگر عدم دخالت آنها

Archive of SID
www.SID.ir

در بازجذب یونی می‌باشد. اما در مطالعه حاضر در قطعه گردنی و توبول‌های پروکسیمال هم ایمونوفلوئورسانس مشاهده شد که این نشانگر دخالت توبول‌های پروکسیمال بخصوص، در ترشح یون‌های دو ظرفیتی می‌باشد.

در آب شور توبول پروکسیمال محل اصلی ترشح یون‌های دو ظرفیتی می‌باشد (۲۱ و ۲۲). مشخص شده است که یکی از راه‌های ترشح یون‌های دو ظرفیتی اگزوسیتوز وزیکول‌های حاوی یون‌های دو ظرفیتی از طریق غشاء راسی سلول‌های اپیتلیال می‌باشد (۲۳). یکی دیگر از راه های ترشح یون‌های دو ظرفیتی در توبول پروکسیمال، از طریق هم انتقالی Na^+/Ca^+, Na^+/Mg^+ می‌باشد که آنزیم‌های این انتقال در قسمت راسی سلول‌های اپیتلیال توبول‌های پروکسیمال قرار دارند و نیروی مورد نیاز برای این هم انتقالی از طریق آنزیم H^+-ATPase در بخش راسی و بیشتر توسط آنزیم Na^+/K^+- ATPase واقع در بخش قاعده‌ای- جانبی سلول‌های اپیتلیال توبول‌های پروکسیمال تامین می‌شود (۲۴).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه در کلیه ماهی هامور معمولی *(E. coioides)*، سلول‌های غنی از میتوکندری و به تبع آنها آنزیم Na^+/K^+-ATPase را می‌توان به روش ایمنیایی مکان‌یابی کرد. با توجه به اینکه در کلیه *E. coioides*، همه توبول‌های کلیوی از خود ایمونوفلوئورسانس نشان دادند که این نشان دهنده‌ی حضور آنزیم Na^+/K^+-ATPase در سلول‌های اپیتلیوم آنها و عدم حضور آن در گلومرول‌ها می‌باشد، می‌توان گفت که سلول‌های غنی از میتوکندری در محیط های مختلف در فرآیندهای حفظ ثبات محیط داخلی بدن جانور به طور قابل ملاحظه‌ای دخالت دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری و مساعدت آقای دکتر صابر خدابنده، آقای جمشید امیری مقدم و آقای حسینی کارشناس آزمایشگاه بیولوژی دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس واقع در شهرستان نور و همچنین از زحمات آقای محمدرضا سامانی کمال تقدیر و تشکر را دارند.

منابع

1. Heemstra PC, Randall JE. Groupers of the World (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An Annotated and Illustrated Catalogue of the Grouper, Rock Cod, Hind, Coral Grouper Known To Date. FAO Fisheries Synopsis. Rome, FAO. 1993; 125 (16): 382.

2. Khodabandeh S, Shahriari Moghaddam M, Abtahi B. 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 Med. J. 2009a; 11(1): 49-54.

3. Kaneko T, Shiraishi K, Katoh F, Hasegawa S, et al. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. Fisheries Science. 2002; 68: 1- 9.

4. Hawkings GS, Galvez F, Goss GG. Seawater acclimation causes independent alterations in Na/K- and H-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. J. Exp. Biol. 2004; 207: 905-912.

5. Marshall M.S, Grosell M. Ion transport, osmoregulation, and acid–base balance. In: Evans DH, Claiborne JB (eds). The physiology of fishes. CRC Press, Boca Raton; 2006; 179–214.

6. Myazaki H, Kaneko T, Uchida S, Sasaki S, et al. Kidney specific chloride channel, OmClC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 2002; 99:15782–15787.

7. Flik G, Varsamos S, Guerreiro P.M.G, Fenwich, X. Drinking in (very young) fish. In: Hosen N., Flik G (eds). Osmoregulation and drinking in vertebratas. SEB Symposium Series. B. Sci. Pub. Ltd, Oxford; 2002; 54: 31- 47.

8. Lin CH, Tsai RS, Lee TH. Expression and distribution of Na^+, K^+-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, Tetraodon nigroviridis, in response to salinity challenge. Comp. Biochem. Physiol. 2004; Part A. 138: 287– 295.

9. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na^+, K^+-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Amer. J. Physiol. 1998; 275: 633–650.

10. Wilson JM, Laurent P. Fish gill morphology: inside out. J. Exp. Zool. 2002; 293: 192– 213.

11. Ura K, Soyano K, Omoto N, Adachi S, et al. Localization of Na^+,K^+-ATPase in tissues of rabbit and teleosts using an antiserum directed against a partial sequence of the α subunit. J. Zool. Sci. 1996; 13: 219– 227.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Khodabandeh S, Khoshnood Z, Mosafer S. Immunolocalization of Na^+, K^+- ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, Acipenser persicus, fry. Aquaculture Res. 2009b; 40: 329- 336.

13. Khodabandeh S, Kutnik M, Aujoulat F, Charmantier G, et al. Ontogeny of the antennal gland in the crayfish Astacusleptodactylus (Crustacea, Decapoda): Immunolocalization of Na^+, K^+- ATPase. Cell Tissue Res. 2004; 319: 167- 174.

14. Nebel C, Romestand B, Nègre-Sadargues G, Grousset E, et al. Differential freshwater adaptation in juvenile sea-bass Dicentrarchus labrax: involvement of gills and urinary system. J. Exp. Biol. 2005; 208: 3859-3871.

15. Ogawa M. Comparative study on the external shape of the teleostean kidney with relation to phylogeny. Sci. Rep. of the Tokyo Daigaku. 1961; B (10): 61–68.

16. Endo M, Kimura M. Structures and functions of segments in some teleostean nephrons. Jap. J. Ichthyol. 1984; 31: 71–78.

17. Katoh F, Cozzi RR, Marshall WS, Goss GG. Distinct Na^+, K^+,$2Cl^-$ cotransporter localization in kidneys and gills of two euryhaline species, rainbow trout and killifish. Cell Tissue Res. 2008; 334: 265–281.

18. Hichman C.P, Trump Jr.B.F. The kidney. In: Hoar W. S., Randall D. J. (eds). Fish Physiology. Vol. 1. New York: Academic Press; 1969; 91-239.

19. Tang CH, Wu WY, Tsai SC, Yoshinaga T, et al. Elevated Na+/K+-ATPase responses and its potential role in triggering ion reabsorption in kidneys for homeostasis of marine euryhaline milkfish (Chanos chanos) when acclimated to hypotonic fresh water. J. Comp. Physiol. 2010; B, 180: 813–824.

20. Charmi A, Parto P, Bahmani M, Kazemi R. Morphological and Histological Study of Kidney in Juvenile Great Sturgeon (Huso huso) and Persian Sturgeon (Acipenser persicus). Amer.-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2010; 7 (5): 505-511.

21. Nishimura H, Fan Z. Regulation of water movement across Vertebrate renal tubules. Comp. Biochem. Physiol. 2003; 136: 479- 798.

22. Beyenbach KW. Kidney sans glomeruli. Amer. J. Physiol. 2003; 286: 811- 827.

23. Varsamos S, Nebei C, Charmantier G, Ontogeny of osmoregulation in post embryonic fishes. Comp. Biochem. Physiol. 2005; 141: 401-429.

24. Hentschel H, Zierold K. Morphology and element distribution of magnesium secretion epithelium: the proximal tubule segment PII of dogfish, Scyliorhinus caniculus (L.). Euro. J. Cell Biol. 1994; 63: 32- 42.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Winter 2012; 2(4): 407-414

Localization and Effect of Hyper and Hypo-osmotic Environments on Distribution of Na^+, K^+- ATPase in Kidney Tubules of Juveniles of *(Epinephelus coioides*)

Roomiani E[1], Abdi R[2*], Zolgharnein H[2], Savari A[2], Morovvati H[3]

1. Post Graduated of Animal Sciences, Young Researchers Club, Khorramabad Branch of Azad University
2. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khoramshahr University of Marine Sciences and Technology
3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ahvaz University of Shahid Chamran

* Email corresponding author: abdir@kmsu.ac.ir

Received: 7 Dec. 2011 Accepted: 10 Apr. 2012

Abstract

Aim: Histological study of kidney nephrons of Epinephelus *coioides* Juveniles and Immunolocalization of Na^+, K^+- ATPase during osmoregulation and adaptation with hypo- and hyper-osmotic (10 and 60 ppt) conditions.

Material and Methods: H & E staining and IgGα_5 and FITC as primary and secondary antibodies were used for kidney nephrons histological studies and Immunolocalization of Na^+, K^+- ATPase, respectively.

Results: Results of microscopic study indicated that kidney nephrons of juvenile grouper were consisted of Glomerulus, Neck segment, Proximal, Distal and Collecting tubules. Immunolocalization of control group showed that Na^+, K^+- ATPase was distributed in all part of nephron structure but glomeruli. In hypo- and hyper-osmotic environments similar to control condition the enzyme distributed into the epithelial cells of proximal, distal and convoluted tubules but was not presence in glomeruli.

Conclusion: The results of present study indicated that, the structure of kidney nephrons of *E. coioides* was similarto that of other euryhaline species and presence of Na^+, K^+- ATPase in basolaterl portion of cell membrane indicated its active role in osmotic and ionic regulation in kidney.

Key words: Grouper, Kidney Tubules, Histology, Na^+ K^+- ATPase, Immunolocalization, Osmoregulation

Archive of SID

www.SID.ir