# مطالعه فرا ساختار و عمل غدد سبز در خرچنگ دراز آب شیرین *Astacus Leptodactylus*

صابر خدابنده* و ناهید شکری

نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، گروه بیولوژی دریا

تاریخ دریافت: 85/8/29 تاریخ پذیرش: 87/6/23

## چکیده

در این مطالعه ساختار عمومی، فراساختاری سلولها و مکان یابی آنزیم $Na^{+}$- $K^{+}$ATPase در غدد شاخکی *Astacus leptodactylus* بررسی شد. هرغده از چهار بخش تشکیل یافته که شامل سلوموساک، لابیرنت، لوله ها و مثانه‌ای حجیم است که توسط یک مجرای کوتاه به سوراخ ادراری متصل شده است. مطالعه فراساختاری نشان داد که سلولهای سلوموساک ماهیت پودوسیتی دارند. این سلولها دارای سیستمهای کمپلکس گلژی، واکوئلها، وزیکولهای آندوسیتوزی می‌باشند و پدیسل های مجزا دارند. سلولهای لابیرنت به دو شکل مکعبی و استوانه ای بوده و دارای چین خوردگیهای غشایی پایه ای، وزیکول های رأسی، میکروویلی‌های رأسی و زوائد سیتوپلاسمی رأسی هستند. لوله ها شامل دو زیر واحد است (لوله های پروگزیمال و دیستال) و سلولها دارای چین خوردگیهای غشایی پایه ای متصل به میتوکندری ها و سیتوپلاسم حاوی تعداد زیادی واکوئل و میتوکندری هستند. این سلولها فاقد میکروویلی های رأسی بوده و همچنین خصوصیات منحصر به فرد در هر ناحیه دارند. آنزیم $Na^{+}$- $K^{+}$ATPas از طریق ایمنوفلوئورسانس در لوله ها و سلولهای مثانه مشاهده شد. یک رنگ پذیری فلوئورسانسی ضعیف نیز در لابیرنت دیده شد ولی در سلوموساک هیچ گونه رنگ پذیری مشاهده نشد، سلولهای لوله و مثانه از لحاظ ریخت شناسی و آنزیمی ماهیت یونوسیتی نشان می دهند، بنابراین غده‌های شاخکی *A. leptodactylus* توانایی تبادل فعال یونها را دارند و در تنظیم اسمزی شرکت می کنند.

**واژه های کلیدی**: *Astacus leptodactylus*، غدد شاخکی، مکان یابی فعالیت $Na^{+}$-$K^{+}$ ATPase

* نویسنده مسئول، تلفن تماس:09144472033، پست الکترونیک: surp78@yahoo.com

## مقدمه

غدد شاخکی در سخت پوستان به عنوان غدد وازنشی یا دفعی که دفع مواد زائد آلی خون و مایعات بدن را برعهده دارد شناخته شده است. با مطالعات انجام شده در برخی از گونه ها دخالت این غدد را در تنظیم اسمزی جانور می توان یافت (1، 4، 7، 8، 9، 15 و 20). در خرچنگ دراز آب شیرین با توجه به رنگ سبز بنام غدد سبز نیز شناخته می شوند. خرچنگ دراز آب شیرین ( Crayfish=Crawfish =Crawded=Ecrevisse ) از سخت پوستان ده پا (Decapode) می باشد که غالباً ساکن آبهای شیرین و معدود جمعیتهایی از آن در آبهای شور یافت می شود. برعکس اکثر بی مهرگان آب شور که فشار اسمزی مایعات بدن آنها با آب دریا هم فشار(Isosmotic) است در بی مهرگان آب شیرین از جمله *Astacus* فشار اسمزی مایعات بدن بیشتر از فشار اسمزی محیط است و به عبارت دیگرHyper-osmotic هستند (16). در چنین شرایطی هجوم آب به بدن جانور از یک طرف و خارج کردن آب اضافی از طرف دیگر یونهای زیادی را از دست می دهند. لذا برای مقابله با این مشکلات *Astacus* سازشهای متعددی یافته است که از جمله می توان به داشتن یک اسکلت خارجی کیتینی کلسیفیه شده (جهت محدود کردن

هجوم آب)، تولید یک ادرار رقیق توسط غدد شاخکی و همچنین تغییرات سلولهای اپیتلیال آبشش (جهت پایین آوردن نفوذ پذیری) اشاره کرد (13). تحقیقات نشان داده که تراز اسمولاریته همولنف در *Astacus leptodactylus* بالغ در حدود420-415 میلی اسمول بر کیلوگرم بوده در حالیکه اسمولاریته آب شیرین معمولاً زیر 5 میلی اسمول بر کیلوگرم است، لذا این جانور یک تنظیم کننده اسمزی موفق می باشد (2).

در آبزیان سلولهای دخیل در تنظیم فشار اسمزی سلولهای یونوسیت (سلولهای غنی از میتوکندری یا کلراید) بوده که با مجهز بودن به تراکم بالای پمپ سدیم – پتاسیم قادر به جابجایی یونها در خلاف شیب غلظت (یعنی به طریق انتقال فعال) هستند. این پمپ معمولاً در تمام سلولهای بدن وجود داشته و کنترل حجم سلولها یکی از مهم ترین اعمال آن می باشد. تراکم بالای این پمپ در سلولهای یونوسیت مسئول حفظ اختلاف غلظت سدیم و پتاسیم در دو طرف غشای سلول است و ضمناً پتانسیل الکتریکی منفی درون سلولها را بر قرار می سازد (3).

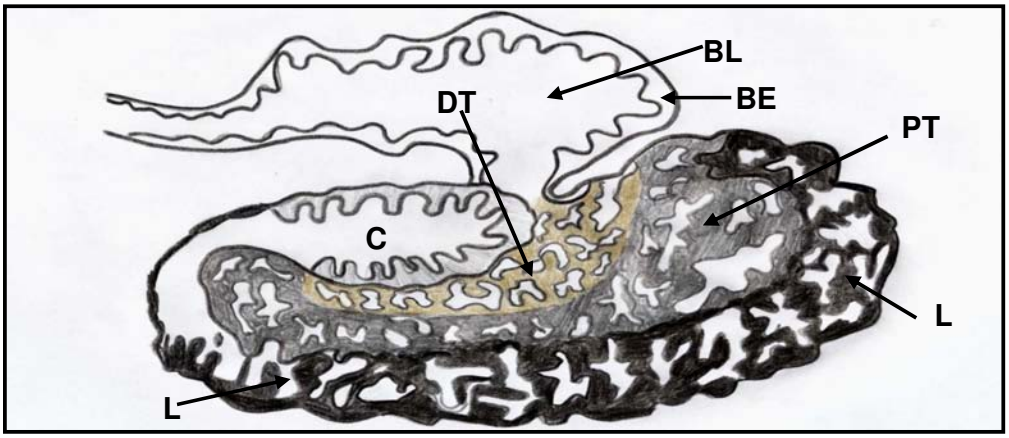
پمپ $Na^+$-$K^+$ از یک واحد پروتئینی شامل دو زیر واحد α و β و همچنین یک بخش آنزیم (ATPase) تشکیل شده است. امروزه تکنیک مکان یابی این آنزیم یکی از مهم ترین و دقیق ترین روش برای شناسایی و پراکنش سلولهای یونوسیت در اندامهای مختلف است. آنزیم $Na^+$- $K^+$ATPase به عنوان یک آنزیم اساسی در تنظیم یونی و آب در کلیه ماهیان (23 و 24) در آبشش و غدد شاخکی سخت پوستان (7، 8، 11، 12، 16 و 22) در لوله های مالپیگی حشرات (10) شناخته می شود. اگرچه مطالعات خوبی روی ساختار غدد سبز و نقش آنها در تنظیم فشار اسمزی گونه های مختلف خرچنگ دراز آب شیرین و مراحل رشد اولیه *Astacus leptodactylus* صورت گرفته اما فراساختار، نقش و خصوصاً مکان یابی سلولهای یونوسیت به روش ایمنوهیستوشیمی در *A. leptodactylus* بالغ بررسی نشده است، لذا این تحقیق با هدف بررسی ساختار غدد شاخکی با استفاده از میکروسکوپ نوری، الکترونی و همچنین مکان یابی آنزیم $Na^+$-$K^+$ATPase و در نتیجه سلولهای یونوسیت به روش ایمنوهیستوشیمی انجام شده است.

## مواد و روشها

**هیستولوژی کلاسیک و ایمنوهیستوشیمی**: در ایران خرچنگ دراز آب شیرین سواحل و رودخانه های واقع در بخش غربی دریای خزر و همچنین تالاب انزلی گونه *Astacus leptodactylus* است که به برخی از رودخانه ها و سدهای مخزنی (مانند ارس) نیز رها سازی شده است. در فروردین ماه سال 1383 تعداد 25 قطعه خرچنگ دراز آب شیرین *A. leptodactylus* بالغ از بندر انزلی صید و به آزمایشگاه منتقل شد. با شکافتن ناحیه روستروم کاراپاس یک جفت غدد سبز (شاخکی) واقع در پایه شاخکها به دقت جداسازی و در محلول بوئن فیکس گردید. نمونه ها بعد از فیکس شدن جهت آبگیری و نگهداری در الکل اتانل 70 درصد قرار داده شد. مراحل آبگیری با استفاده از الکلهای 90، 95 و 100 درصد و نهایتاً با الکل بوتیلیک انجام گرفت. نمونه ها بعد از 9 ساعت نگهداری در داخل پارافین مایع (داخل اون با دمای 60 درجه سانتی گراد) قالب گیری و با میکروتوم برشهای 5 میکرومتری از آنها تهیه گردید. برشها روی لامهای پلی-ال-لیزینه چسبانده و در اون 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای مطالعه ساختار بافت شناسی کلاسیک، لامها بوسیله هماتوکسلین و ائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه و عکس برداری شد (7 و 14). همچنین برای شناسایی و تشخیص ساختارهای غدد شاخکی و نامگذاری آنها از مأخذ جنین شناسی غدد شاخکی در *A. leptodactylus* استفاده گردید (7 و 8).

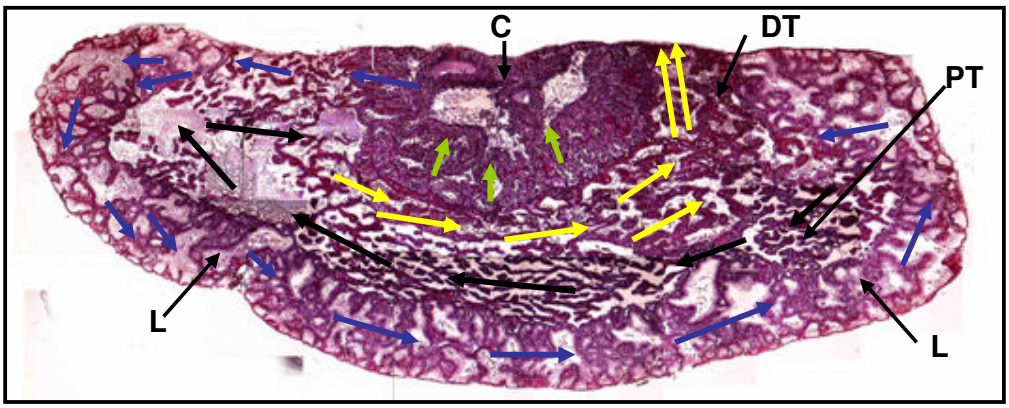
مکان یابی آنزیم $Na^+$-$K^+$-ATPase با استفاده از آنتی کور $IgG\alpha_5$ و میکروسکوپ نوری فلورسانس انجام گرفت.

برای مطالعه ایمونو هیستوشیمی، لامها بعد از پارافین زدایی در LMR و آبگیری در الکل اتانول، به ترتیب 1 دقیقه در محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) ، 10 دقیقه در محلولA (400 سی سی PBS ده میلی مول + 3/5 گرم کلرید سدیم) و 2 دقیقه در محلول B (50 درصد PBS و 50 درصد Regiler) قرار داده شدند. سپس لامها به مدت 2 دقیقه در محلول PBS آب کشیده و داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب، به طوری که سطح برشها به طرف بالا باشد، چیده شد. بر روی هر لام 2-3 قطره از آنتی کور $IgG\alpha_5$ رقیق شده در PBS اضافه و به مدت 2 ساعت در دمای اتاق نگه داری شد. بعد از سپری شدن این دو ساعت، 2-3 قطره از آنتی کورFITC (Flouorescein Isothiocyanade Conjugated) روی هر لام اضافه و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شد . سپس لامها در PBS آب کشیده شده و با استفاده از مایع مونتاژ، مونتاژ گردید. لامها بعد از قرار دادن لامل روی آنها در جعبه های مخصوص چیده شده و برای حفظ خواص فلورسانسی در جای کاملاً تاریک نگهداری شد. لامها توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس (Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak 1- Lambda Lamp) با فیلترهای 490-450nm مشاهده و از آنها عکس برداری شد (8، 9، 10، 11 و 12).




شکل 1: طرحی از برش طولی از وسط یک غده شاخکی *Astacus*
BE: Bladder Epithelium ; بافت پوششی مثانه BL: Bladder Lumen فضایی اداری مثانه
C: Coelomosac ;سلوموساک DT: Distal Tubule ;لوله دیستال L: Labyrinth ;لابیرنت
PT: Proximal Tubule لوله پروگزیمال

**فرا ساختار** : جهت مطالعه فرا ساختار سلولهای قسمتهای مختلف غدد شاخکی از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission) استفاده شد. بدین منظور بخشهای مختلف غدد شاخکی بعد از جداسازی دقیق به مدت 2 ساعت در محلول گلوتارآلدئید 0/5 درصد حاوی 0/2 مول بافر کاکودیلات سدیم با pH 7/4 تثبیت شد. پس از آن نمونه ها در بافر کاکودیلات آب کشیده شده و در داخل مخلوط (V/V) 2 درصد تتراکسید اسمیوم و 0/45 مول بافر کاکودیلات سدیم به مدت یک ساعت قرار داده شدند. نمونه ها سپس در سری الکل اتانول آب گیری شده در داخل Epon 812 قالب گیری شدند. از قالبها با استفاده از الترا میکروتوم Reichert OMU2 برشهای ظریفی به ضخامت 90 نانومتر تهیه و پس از قرار دادن روی صفحات توری مسی (Grids) بوسیله استات اورانیل و سیترات سرب رنگ آمیزی شد. نمونه ها با میکروسکوپ الکترونی JEOL 1200EX2 مطالعه شده و از آنها عکس برداری انجام گردید(5، 7 و 9).



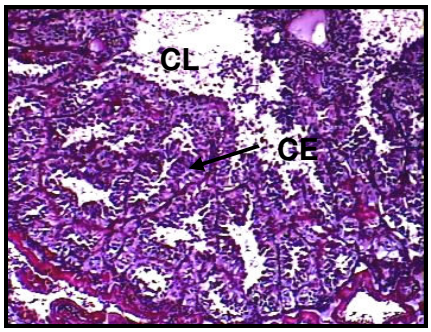

شکل 2 : برش طولی یک غده شاخکی *Astacus* رنگ آمیزی شده با هماتوکسلین و ائوزین

C: Coelomosac سلوموساک; L: Labyrinth لابیرنت ; PT: Proximal Tubule لوله پروگزیمال

DT: Distal Tubule لوله دیستال

## نتایج

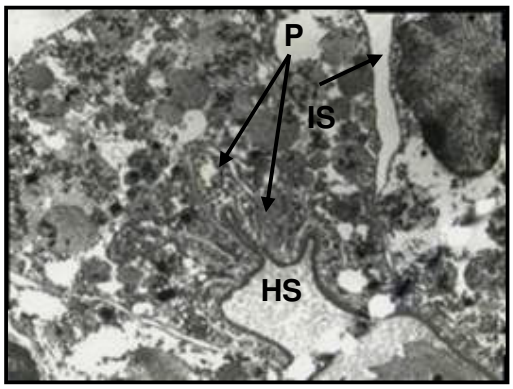
**ساختار عمومی**: غدد شاخکی *Astacus* بصورت یک جفت غده در ناحیه کف بخش سر- سینه درست در پایه شاخکها قرار گرفته اند. هر غده شامل یک قسمت فشرده غده ای و یک مثانه حجیم می باشد که از طریق یک مجرا از ناحیه پایه ای شاخک به بیرون مربوط می شود (شکل1). هر غده شامل یک بخش مزودرمی بنام سلوموساک و دو بخش اکتودرمی یعنی لابیرنت و لوله می باشد (شکلهای 1 و 2). ساختار سلوموساک شبیه کپسول بومن در مهره داران است (شکل 3). همولنف با استفاده از عروق به ناحیه سلوموساک انتقال داده شده، فیلتر می شود. سپس مایع صاف شده وارد لابیرنت شده و از آنجا وارد ناحیه لوله ای و در نهایت مثانه می گردد (شکل 2). ادرار در مثانه جمع و از مجرایی به بیرون دفع می شود (شکلهای 1 و 2). در لابیرنت بافت فشرده بوده و فضاهای ادراری کمتر و کوچکتر می باشند (شکلهای 7 و 8 ). ناحیه لوله ای از دو بخش I و II تشکیل شده است و فضاهای ادراری در لوله اول وسیع تر از لوله دوم است (شکلهای 2 و 12 و13).




شکل 3: قسمتی از ناحیه سلومو ساک غده

CE: Cytoplasmic Extrusion بیرون زدگیهای سیتوپلاسمی

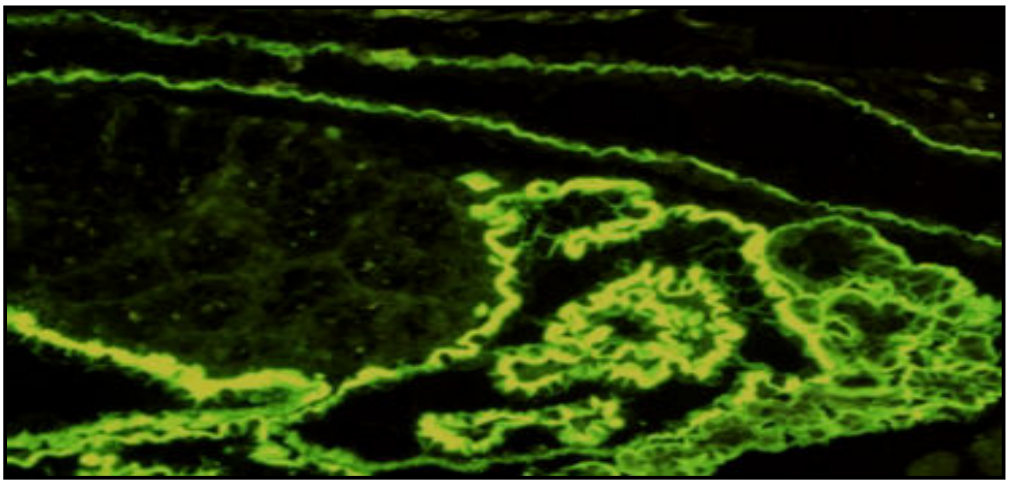
CL: Coelomosac Lumen فضای سلوموساک




شکل 4: یک سلول پودوسیت سلوموساک

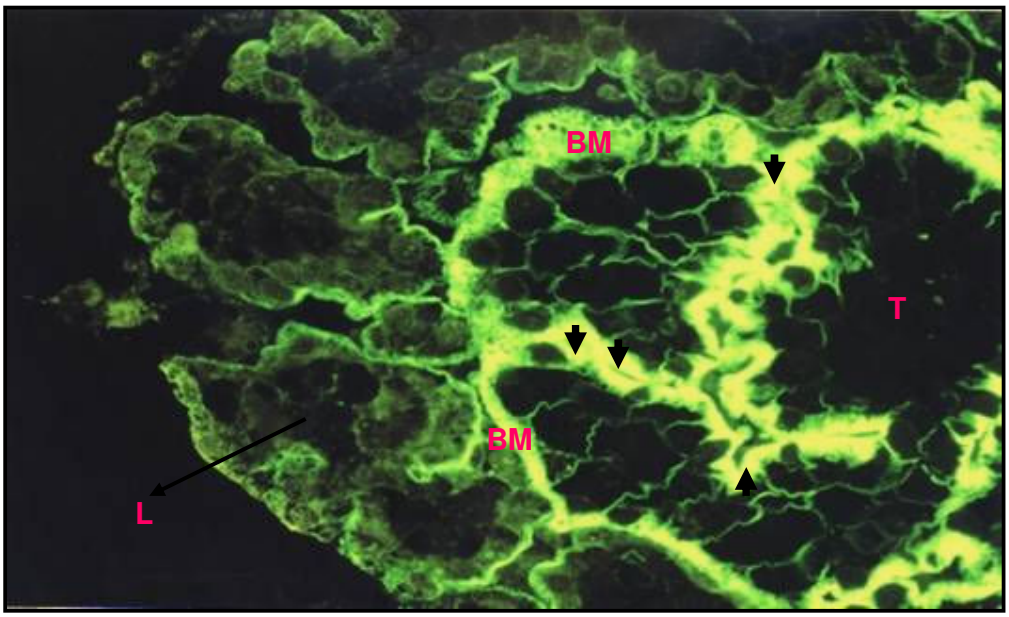
HS: Hemolymph Space فضای همولنفی; IS: Intercellular Space فضای بین سلولی

P: Pedicels پایکها



شکل 5: قسمتهای مختلف یک غده شاخکی *Astacus* سلوموساک رنگ پذیری فلوئورسانسی از خود نشان نمی دهد. مقدار کمی رنگ پذیری فلوئورسانس در ناحیه لابیرنت دیده می شود. رنگ پذیری قابل ملاحظه ای در بخش لوله ای و مثانه دیده می شود.

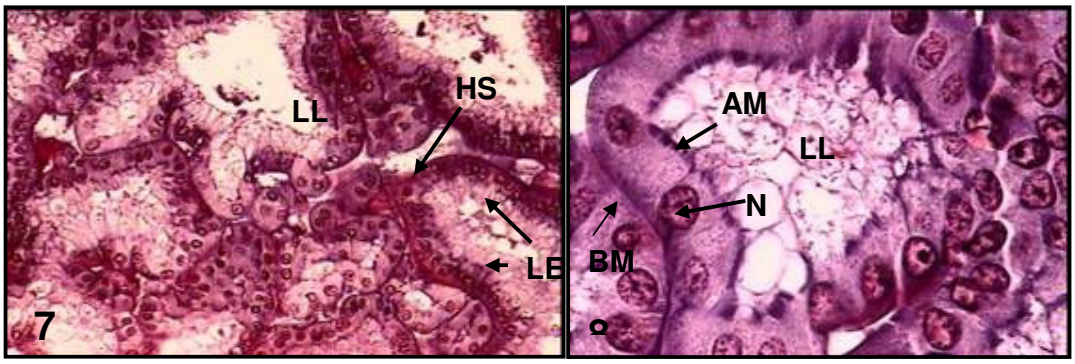
لوله T: Tubule ; لابیرنت L: Labyrinth ; سلوموساک C: Coelomosac ;بافت پوششی مثانه BE: Bladder Epithelium




شکل6: قسمتی از شکل 5 را با بزرگنمایی بیشتر نشان می دهد.

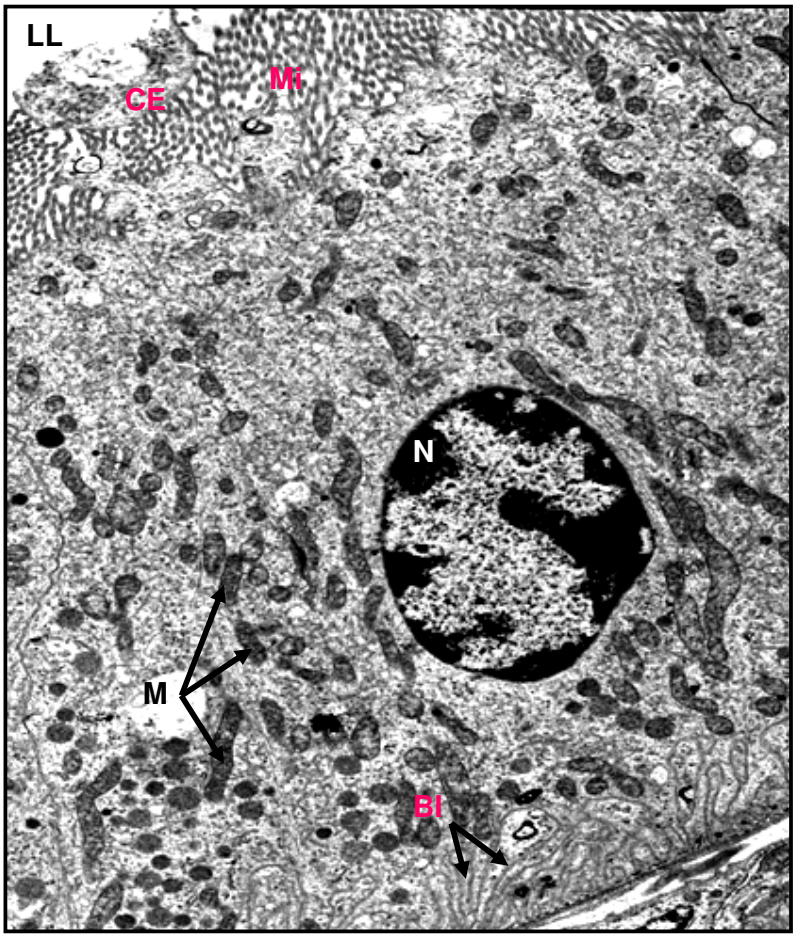
غشای قاعده‌ای BM: Basal Membrane ; لوله T: Tubule ; لابیرنت L: Labyrinth

**مکان یابی آنزیم $Na^+$-$K^+$ATPase** : استفاده از آنتی کورهای $IgG\alpha_5$ و FITC موجب ظاهر شدن آنزیم $Na^+$-$K^+$ATPase به صورت فلوئورسانس در مکانهایی که حضور دارد، می شود. نتایج استفاده از آنتی کورها نشان داد که در غدد شاخکی *Astacus* سلولهای سلوموساک هیچ واکنش فلوئورسانسی از خود نشان نمی دهند (شکل 5) و یا فعالیت آنزیم $Na^+$- $K^+$ATPase قابل ملاحظه ای در آنها دیده نمی شود. واکنش رنگ پذیری ضعیف از این آنزیم در ناحیه لابیرنت غدد مشاهده گردید (شکل 6) . در ناحیه لوله ای و مثانه غدد شاخکی *Astacus*، سلولها رنگ پذیری بیشتر و متراکمی نشان دادند (شکلهای 5 و 6). در تمام مواردی که این آنزیم حضور داشت ناحیه قاعده ای- جانبی سلولها غلظت و تراکم بالایی از این آنزیم را نشان دادند (شکل 6).




اشکال 7 و 8: قسمتی از ناحیه لابیرنت یک غده رنگ آمیزی شده با هماتوکسلین و ائوزین

AM: Apical Membrane غشای انتهایی BM: Basal Membrane ; غشای قاعده ای; HS: Hemolymph Space فضای همولنفی ;
LE: Labyrinth Epithelium بافت پوششی لابیرنت LL: Labyrinth Lumen ; فضای اداری لابیرنت N: Nucleus ; هسته

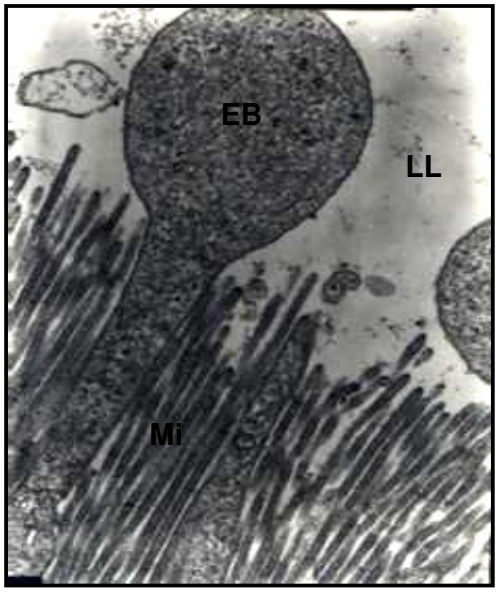



شکل 9: فرا ساختار یک سلول مکعبی بخش لابیرنت.

BI: Basal Infoldings فرورفتگیهای قاعده ای; CE: Cytoplasmic Extrusion بیرون زدگیهای سیتوپلاسمی;
LL: Labyrinth Lumen فضای اداری لابیرنت ; M: Mitochondria میتوکندری; Mi: Microvilli میکروویلی N: Nucleus هسته

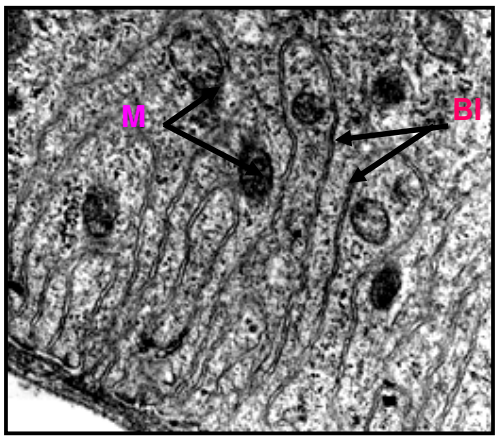
**فرا ساختار**: مطالعه فراساختار سلولهای مناطق مختلف غدد شاخکی *Astacus* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلولها اختصاصات متفاوتی نسبت به یکدیگر دارند. سلولهای سلوموساک در ناحیه قاعده ای با پایکهای انگشتی با یکدیگر و همچنین با غشای پایه رگها در ارتباط هستند (شکل 4). این عمل سطح تماس بین همولنف و سلولهای سلوموساک را افزایش می دهد. این سلولها دارای دستگاه گلژی، واکوئل و حتی وزیکولهای آندوسیتوزی می باشند (شکل 4). بافت پوششی ناحیه لابیرنت فشرده و دارای فضاهای ادراری محدودی بوده (شکل2) که این فضاهای ادراری معمولاً از مواد مترشحه کروی شکل که توسط سلولها ترشح می شود پر شده است (شکلهای 7 و 8). از نظر فراساختاری سلولهای ناحیه لابیرنت متفاوت از سلولهای سلوموساک می باشند. مشاهدات نشان داد که دو نوع سلول (سلول مکعبی شکل و سلول استوانه ای) در لابیرنت قابل تشخیص است. سلولهای مکعبی شکل (شکل 9) که دارای هسته در ناحیه قاعده ای، میکروویلی ها در بخش انتهایی و بیرون زدگیهای سیتوپلاسمی رأسی می باشند. نظم و ترتیب میکروویلی ها معمولاً توسط این بیرون زدگیهای سیتوپلاسمی به هم خورده است. درسیتوپلاسم سلولها تعداد زیادی میتوکندری و همچنین وزیکول های آندوسیتوزی در بخش انتهایی سلول دیده می شود (شکل 9).

سلولهای استوانه ای دارای میکروویلی های انتهایی توسعه یافته و منظم هستند. از بین میکروویلی ها وزیکولهای ترشحی حبابی شکل بزرگی سلول را ترک کرده و وارد فضای ادراری می شوند (شکل 10). در قسمت غشای پایه ای سلولها، فرورفتگیهای نامنظم همراه با تعداد معدودی میتوکندری دیده می شود (شکل 11).




شکل 10: فراساختار ناحیه انتهایی یک سلول استوانه‌ای بخش لابیرنت

EB: Excretory Bubbles حبابهای دفعی ; LL: Labyrinth Lumen فضای اداری لابیرنت ; Mi: Microvilli میکروویلی

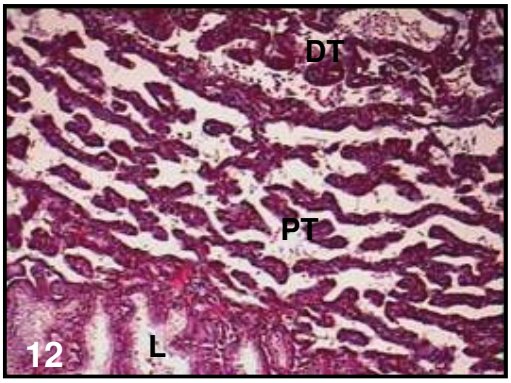


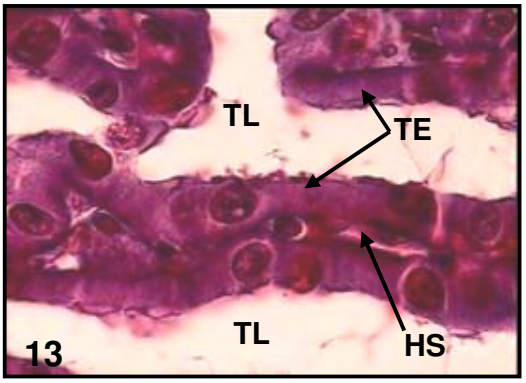

شکل 11: فراساختار ناحیه قاعده‌ای یک سلول استوانه‌ای بخش لابیرنت

BI: Basal Infoldings فرورفتگیهای قاعده ای; M: Mitochondria میتوکندری

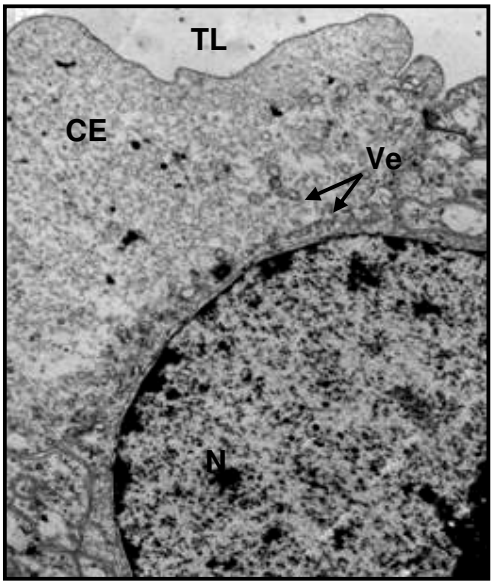
بخش لوله ای غدد از دو بخش لوله I (Proximal) و لوله II (Distal) تشکیل شده است. سلولهای لوله ای عاری از میکروویلی هستند. فضاهای ادراری در لوله I بیشتر از لوله II است (شکلهای 12 و 13). در بخش لوله پروگزیمال سلولهای مکعبی شکل، هسته مرکزی با یک سیتوپلاسم همگن با تعداد کمی اندامک و وزیکول در ناحیه رأسی

وجود دارد (شکل 14) . در ناحیه انتهایی گاهی سلول به طرف مجرای داخل لوله (Lumen) تحدب پیدا کرده و برخی اوقات بیرون زدگیها ی سیتوپلاسمی نیز دیده می شود (شکل14). سلولها در ناحیه قاعده ای فرورفتگیهای نامنظم و متعدد و عمیقی همراه با میتوکندریها دارند (شکل 15).



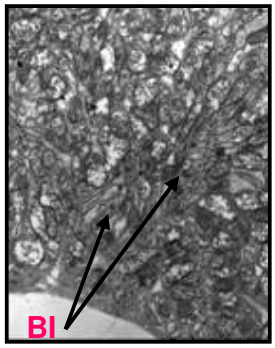




اشکال 12 و 13: قسمتی از ناحیه لوله ای یک غده رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسلین و ائوزین
DT: Distal Tubule لوله دیستال HS: Hemolymph Space ;فضای همولنفی ; L: Labyrinth لابیرنت
PT: Proximal Tubule لوله پروگزیمال TE: Tubule Epithelium ; بافت پوششی لوله TL: Tubule Lumen ; فضای (ادراری) لوله




شکل 14: فرا ساختار ناحیه انتهایی یک سلول بخش لوله پروگزیمال یک غده: CE: Cytoplasmic Extrusion بیرون زدگیهای سیتوپلاسمی ; N: Nucleus هسته TL: Tubule Lumen فضای (ادراری) لوله Ve: Vesicle ; وزیکول

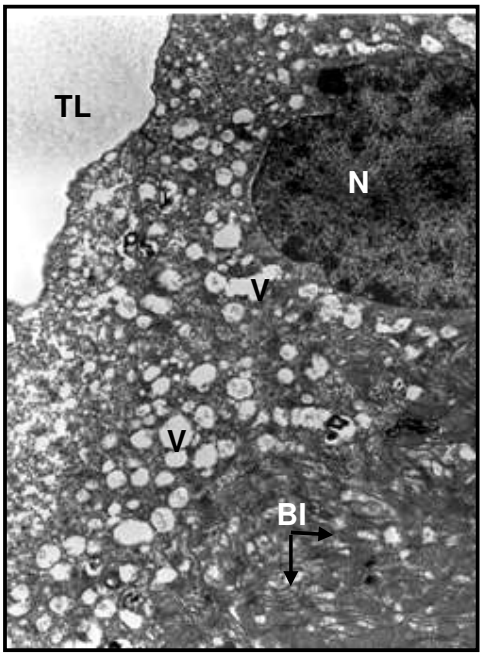
در بخش لوله دیستال، سلولها بزرگ، استوانه ای با یک هسته مرکزی هستند و سیتوپلاسم دارای تعداد زیادی واکوئل های سفید رنگ در بخش رأسی است (شکل 16). فضای ادراری در این بخش از لوله باریک و محدود شده غشای قاعده ای این سلولها فرورفتگیهای منظم و وسیعی با تعداد زیادی میتوکندری دارد. این میتوکندریها کشیده بوده با فرورفتگیهای غشای قاعده ای در ارتباط نزدیک می باشند (شکل 16).




شکل 15: فرا ساختار ناحیه قاعده ای یک سلول بخش لوله پروگزیمال یک غده BI: Basal Infoldings فرورفتگیهای قاعده ای

مثانه متشکل از یک لایه منفرد از سلولهای پوششی(Epithelium) که توسط غلافی از بافت پیوندی پوشیده شده می باشد (شکلهای 17 و 18). سلولها عاری از میکروویلوزیته بوده و ناحیه رأسی سلولها به طرف فضای ادراری مثانه بر آمده می باشد (شکل19). هسته سلولها مرکزی بوده وسیتوپلاسم را به دو بخش مجزا می کند (شکل 19). بخش پایه ای سلولها دارای تعداد

خیلی زیادی فرورفتگیهای غشای قاعده ای بوده که با تعداد زیادی میتوکندری های ریز و متراکم همراه شده و سیتوپلاسم بالای هسته که حاوی تعداد زیادی واکوئل های سفید رنگ است به صورت روشن تر دیده می شود. (شکل 19).



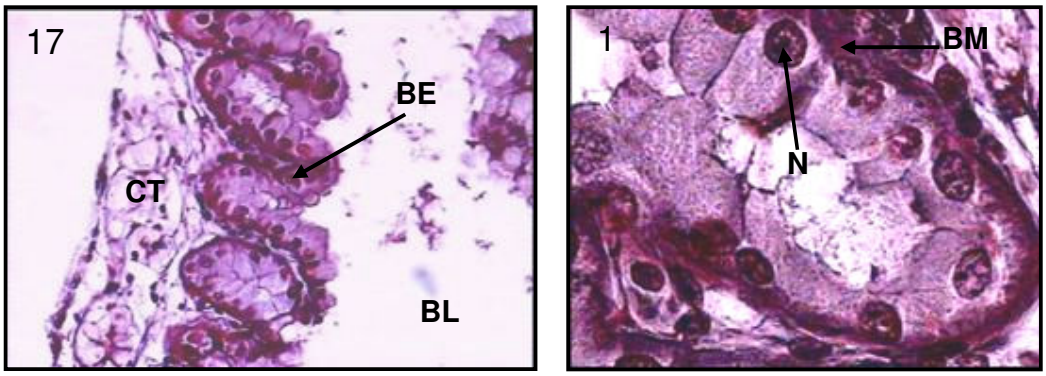

شکل 16: فرا ساختار یک سلول بخش لوله دیستال یک غده
BI: Basal Infoldingsفرورفتگیهای قاعده ای; N: Nucleus هسته
TL: Tubule Lumen فضای (ادراری) لولهV: Vacuole ; واکوئل

## بحث

مطالعات حاضر روی غدد شاخکی *Astacus leptodactylus* نشان داد که هر غده از یک بخش غده ای شامل سلوموساک، لابیرنت و لوله تشکیل شده است. یک مثانه وسیع روی غده را می پوشاند و هر مثانه بوسیله یک مجرا که منفذ آن در قاعده شاخکها قرار دارد به بیرون مرتبط است. ساختار کلی هر غده معادل یک نفرون در مهره داران است. به این صورت که سلولهای سلوموساک با داشتن فضاهای بین سلولی وسیع، پایکهای انگشتی زیاد (pedicels)، اجسام متراکم، وزیکول ها و واکوئل ها معادل سلولهای پودوسیت کپسول بومن مهره داران است. مشاهدات فراساختاری و خصوصاً عدم حضور آنزیم $Na^{+}$-$K^{+}$ATPase مبین شرکت فعال آنها در عمل فیلتراسیون همولنف می باشد. یعنی همان وظیفه ای که سلولهای پودوسیت کپسول بومن انجام می دهند. تحقیقات گذشته روی برخی از سخت پوستان نشان داده که سلولهای سلوموساک فعالیت فیلتراسیون بالا و ترشح را همانند پودوسیتهای نفرون مهره داران از خود نشان می دهند به طوری که فعالیت ترشحی این سلولها به فرم حباب از آنها خارج شده و جزئی از ادرار می شود (8، 16، 17 و 21) .

اندازه گیری فعالیت آنزیم $Na^{+}$-$K^{+}$ATPase در غده های شاخکی دو گونه *Procambarus clarcki* و *P. blandengi* نشان داده که سلوموساک پایین ترین فعالیت آنزیم را نسبت به سایر نواحی غده نشان می دهد (6). همچنین نتایج تحقیقات روی مکان یابی آنزیم $Na^{+}$-$K^{+}$ATPase در مراحل رشد جنینی *Astacus* و در افراد بالغ خرچنگ دراز دریایی (*Homarus gammarus*) نشان داده که حضور این آنزیم در بخش سلوموساک غدد شاخکی نامحسوس است ( 8 و 9) نتایج فوق با نتایج ایمنوهیستوشیمی تحقیق حاضر مطابقت دارد.

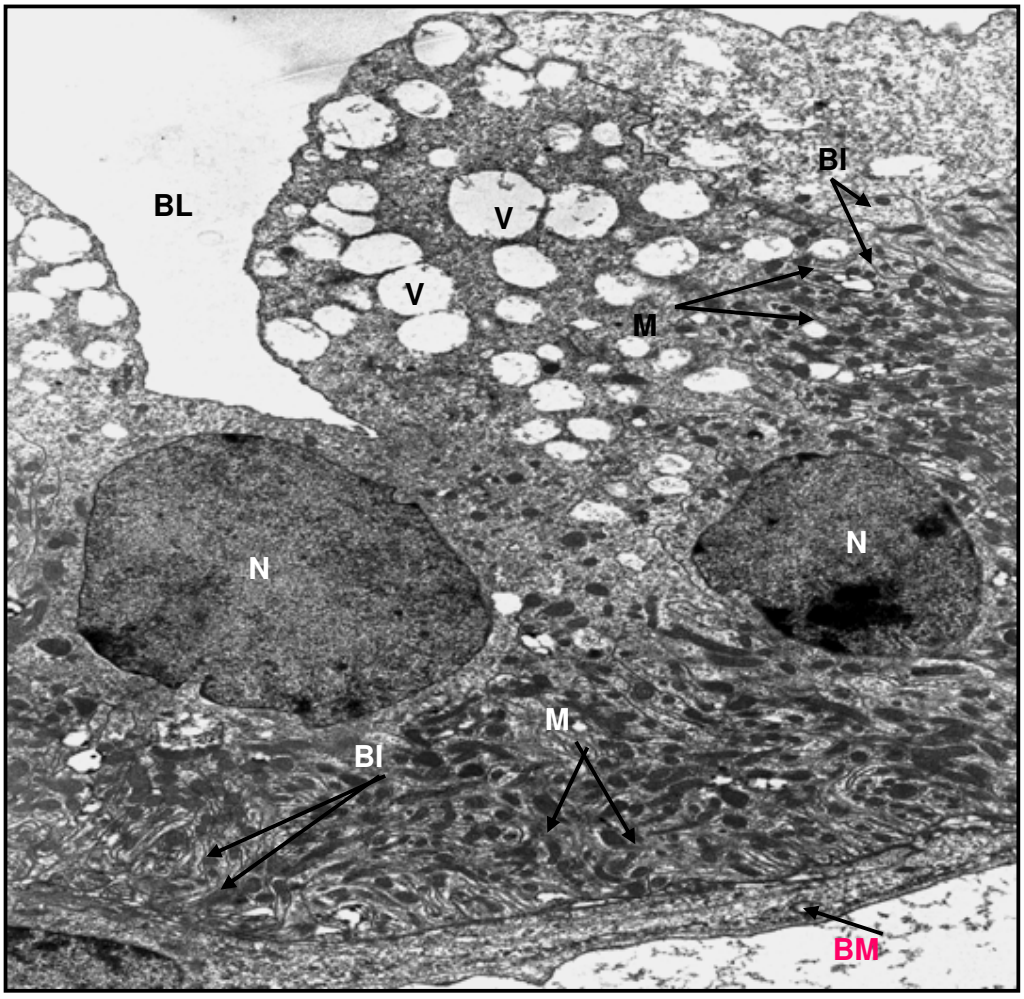
ویژگیهای فراساختاری خاص سلولهای لابیرنت در *Astacus* از قبیل: میکروویلی ها، وزیکول ها، برجستگی یا بیرون زدگی سیتوپلاسمی انتهایی، حبابهای ترشحی، میتوکندری های فراوان و واکوئل ها مبین فعال بودن این سلولها در جذب مواد حیاتی صاف شده توسط سلوموساک و همچنین دفع مواد زاید همولنف می باشد. حضور کم آنزیم $Na^{+}$-$K^{+}$ATPase نقش کم این قسمت غده در امر تنظیم یونی را بیان می کند. نتایج تحقیقات روی سایر گونه ها نقش سلولهای لابیرنت در جذب گلوکز، اسید آمینه ها و سایر اسید های آلی و همچنین دفع مواد زائد را نشان داده است (19 و 25).




اشکال 17 و 18: قسمتی از مثانه یک غده رنگ آمیزی شده با هماتوکسلین و ائوزین

BM: Basal Membrane غشای قاعده‌ای; BE: Bladder Epithelium بافت پوششی مثانه; BL: Bladder; Lumen فضایی اداری مثانه

N: Nucleus هسته; CT: Connective Tissue بافت پیوندی




شکل 19: فرا ساختار دو سلول بافت پوششی قسمت مثانه یک غده

BI: Basal Infoldings فرورفتگیهای قاعده ای; BL: Bladder; Lumen فضایی اداری مثانه; BM: Basal Membrane; غشای قاعده‌ای;

M: Mitochondria میتوکندری; N: Nucleus هسته; V: Vacuole; واکوئل

سلولهای لوله ای فاقد میکروویلی هستند و ناحیه قاعده ای آنها، جهت افزایش سطح تبادلات، فرورفتگیهای وسیعی پیدا کرده و با تعداد زیادی میتوکندری همراه شده اند. آنزیم $Na^{+}$- $K^{+}$ATPase با تجمع قابل ملاحظه ای در روی این فرورفتگیها حضور دارد. براساس مختصات فراساختاری و حضور آنزیم می توان گفت که سلولهای لوله ای دارای اختصاصات سلولهای یونوسیت بوده و نقش مهمی در باز جذب یونها ایفا می کند. به نظر می رسد از میان سلولهای لوله ای نیز سلولهای لوله ای II نقش بیشتری در باز جذب یونها و در نهایت در تنظیم اسمزی داشته باشد. نقش سلولهای لوله ای در بازجذب یونها مانند سدیم و کلر و تشکیل ادرار رقیق در برخی از گونه های سخت پوستان قبلاً نیز گزارش شده است (18، 25 و 26).

اختصاصات سلولهای مثانه ای نیز مبین حضور یونوسیت ها بودند. ضمناً وجود واکوئل های سفید و فراوان در ناحیه بالای هسته ای نقش این سلولها در دفع آب اضافی وارد شده به بدن را آشکار می سازد. در تحقیقات گذشته مطالعه فراساختار و نقش مثانه در جذب یونها کمتر مورد توجه واقع شده و این بخش غده به عنوان محل تجمع و دفع ادرار شناخته شده است. اما بررسیهای فراساختاری و مکان یابی آنزیم $Na^{+}$- $K^{+}$ATPase در تحقیق حاضر نشان داد که نقش مثانه فراتر از نگهداری ادرار بوده و بافت پوششی دیواره آن نقش مهمی در بازجذب یونها و خروج آب دارد.

نتیجه گیری کلی اینکه در *Astacus leptodactylus* هر غده از بخشهای سلوموساک، لابیرنت (با دو نوع سلول)، لوله ای (با دو بخش) و مثانه تشکیل شده است. همولنف توسط سلولهای سلوموساک فیلتر شده و مایع صاف شده وارد لابیرنت می گردد. در لابیرنت مواد حیاتی موجود در مایع صاف شده بازجذب و مواد زائد مانده در همولنف ترشح می گردد. مایع صاف شده سپس وارد لوله شده که علاوه بر نقش ترشح مواد زائد در باز جذب یونها نیز دخالت دارد. بیشترین اعمال مربوط به باز جذب یونها را لوله انجام داده و در واقع تشکیل ادرار واقعی از این قسمت شروع شده و در بخش مثانه کامل می شود.

## منابع


1. Anderson, E.; Beams, H.W., 1956. Light and electron microscopic studies on the cells of the labyrinth in the green gland" of *Cambarus* sp. Iowa Acad Sci. Vol. 63. Pp.681-685.
2. Charmantier, G.; Hoand, C.; Lignot, J.H. and Charmantier-Daures, M., 2001. Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: a review in Homarid lobsters. J. Exp. Biol. Vol.204. Pp.967-977.
3. De Renzis, G. and Bornanvin, M. , 1984. Fish physiology, gills, XB. Academic Press, Orlando, Pp.65-104.
4. Fuller, E.G.; Highison, G.J.; Brown, F. and Bayer, C., 1989. Ultrastructure of the crayfish antennal gland revealed by scanning and transmission electron microscopy combined with ultrasonic microdissection. J. Morph. Vol.200. Pp. 9-15.
5. Glauret, M. A., 1974. Practical Methods in Electron Microscopy, North Holland Publishing-Amsterdam. Oxford, Vol. 3. Pp.353.
6. Kamemoto, F.I. and Tullis, R.E., 1972. Hydromineral regulation in Decapoda Crustacea. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 3. Pp.299-307.
7. Khodabandeh, S.; Charmantier, G.; Blasco, C.; Grousset, E. and Charmantier-Daures, M. , 2005a. Ontogeny of the antennal glands in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): anatomical and cell differentiation. Cell Tissue Res. Vol. 319. Pp.153-165.
8. Khodabandeh, S.; Kutnik, M. ; Aujoulat, F. ; Chartmantier, G. and Charmantier-Daures, M. , 2005b. Ontogeny of the antennal glands in the Crayfish, *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): immunolocalization of $Na^{+}$, $K^{+}$-ATPase. Cell Tissue Res. Vol. 319. Pp.167-174.
9. Khodabandeh, S.; Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. , 2005c. Ultrastructural studies and $Na^{+}$,$K^{+}$-ATPase immunolocalization in the antennal urinary glands of the lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). J.

Histochem. Cytochem. Vol. 53 (10). Pp.1203-1214.

10. Khodabandeh, S., 2005. $Na^+$,$K^+$-ATPase in the gut of the Zygoptera *Ischnura elegans* and Anisoptera *Libellula lydia* larvae (Odonata): activity and immunocytochemical localization. J. Zool. Studies. Vol. 45(4). Pp. 510-516.
11. Lignot, J.H.; Charmantier-Daures, M. and Charmantier, G., 2001. Immunolocalization of $Na^+$,$K^+$-ATPase in the organs of the branchial cavity of the European Lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda ). Cell Tissue Res. Vol. 296. Pp.417-426.
12. Lignot, J.H.; Sunsanto, G.N.; Charmantier-Daures, M. and Charmantier, G., 2005. Attention:Immunolocalization of $Na^+$,$K^+$-ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda ). Cell Tissue Res. Vol. 319. Pp.331-339.
13. Mantel, L.H. and Farmer, L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation. In Bliss DE, ed. The biology of crustacea, Vol 5. Internal Anatomy and physiological Regulations. Academic Press, London.
14. Martoja, R. and Martoja-Pierson, M.,1967. Initiation aux techniques de histology animale. Masson et Cie, Paris, p. 345.
15. Miyawaki, M. and Ura, T., 1969. Absorption and secretion of experimentally injected protein silver by kidneys cells of the crayfish. Ann. Zoo. Jpn. Vol. 42. Pp.56-62.
16. Pequeux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. J. Crust. Biol. Vol. 15. Pp.1-60.
17. Peterson, D.R. and Loizzi, R.F., 1975. Biochemical and cytochemical investigation of $Na^+$,$K^+$-ATPase in the crayfish kidney. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 49A. Pp.763-773.
18. Riegel, J.A. and Cook, M.A., 1975. Recent studies of excretion in crustaceans. Fortschr. Zool. Vol. 23. Pp.48-75.
19. Sarver, G.L.; Flynn, M.A. and Holliday, C.W., 1994. Renal $Na^+$,$K^+$-ATPase and osmoregulation in the crayfish *Procambarus clarkii.* Comp. Biochem. Physiol. Vol. 107A. Pp.349-356.
20. Schaffner, A. and Rodewald, R., 1978. Filtration barriers in the coelomicsac of the crayfish, *Procambarus clarkii.* J. Ultrasructure. Res. Vol. 65. Pp.36-47.
21. Sesma, P.; Bayona, C.; Villaro, A.C. and Vazquez, J.J., 1983. A microscopic study on the antennal gland of *Antrapotamobius ballines* (Crustacea, Decapoda). MORFOL NORM PATOL. Vol. 7. Pp.289-301.
22. Susanto, G.N. and Charmantier, G., 2000. Ontogeny of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. Physiol. Biochem. Zool. Vol. 73. Pp.169-176.
23. Varsamos, S., Nebel, C. and Charmantier, G. 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review, Comp. Biochem. Physiol. Vol. 141(4). Pp. 401-429.
24. Venturini, G.; Cataldi, E.; Marino, G.; Pucci, P.; Garibaldi, L. and Bronzi, P. and Cataudellas, S., 1992. Serum ions concentration and ATPase activity in gills, kidney and oesophagus of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), during acclimation trials to freshwater. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 103. Pp.451-454.
25. Vogt, G., 2002. Functional Anatomy. In Holdich DM, ed. Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford.
26. Wheatly, M.G. and Gannon, T.A., 1995. Ion regulation in crayfish:freshwater adaptations and the problem of molting. Am. Zool. Vol. 35. Pp.49-59.

# Ultrastructural Studies and Function of Green Glands (Antennal Glands) in Crayfish *Astacus leptodactylus*

**Khodabandeh S. and Shokri N.**

**Faculty of Marine Science, Tarbiat Modarres University, Noor, I.R. of Iran**

## Abstract

In this study, the general morphology, ultrastructure of the cells and the localization of $Na^{+}$– $K^{+}$ATPase were examined in the antennal glands of *Astacus leptodactylus*. Each gland is composed of four units, including the coelomosac, the labyrinth, the tubule and a voluminous bladder, linked by a short duct to the urinary pore. Ultrastructural observations have shown that the cells of coelomosac possess podocytic feature. These cells have Golgy complex systems, vacuoles, endocytotic vesicles and they possess distinctive pedicels. The labyrinth cells (cuboidal and columnar cells) present basal membrane infoldings, apical vesicles, apical microvilli and apical cytoplasmic extrusions. The tubule is consist of two sub-unit (proximal and distal tubules) and the cells present in common basal membrane infoldings associated with mitochondria, and cytoplasm including numerous vacuoles and mitochondria. These cells have not apical microvilli and they also present distinctive characters in each sub-unit. $Na^{+}$– $K^{+}$ATPase was detected through immunofluorescene in the tubule and bladder cells with an increasing concentration. A weak fluorescence was also shown in labyrinth and no immunofluorescence was detected in the coelomosac. The cells of the tubules and the bladder present morphological and enzymatic feature of ionocytes. Thus, the antennal glands of the *A. leptodactylus* possess active ion exchanges capabilities and participles in osmoregulation.

**Key words**: *Astacus leptodactylus*, Antennal glands, Immunolocalization, $Na^{+}$– $K^{+}$ATPase