

## روند ظهور یونوسیت‌های آبشش و پوست در مراحل اولیه رشد و نمو لارو

### سوف سفید دریای خزر (*Sander lucioperca*)

محدثه احمدنژاد<sup>1</sup>، شهربانو عریان<sup>2</sup>، محمود بهمنی<sup>3</sup>، محمد صیاد بورانی<sup>1</sup>

1- پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی ایران، بندرانزلی، ایران. m\_ahmadnezhad@yahoo.com

2- دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

3- موسسه تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: 93/12/26 تاریخ پذیرش: 93/2/27

#### چکیده

مقدمه و هدف: ماهی سوف سفید (*Sander lucioperca*) از ماهیان مهم اقتصادی دریای خزر می‌باشد که به دلیل کاهش ذخایر آن در سال‌های اخیر، تکثیر نیمه مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان آن برای احیای نسل به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر انجام می‌گیرد. مطالعه در مورد تنظیم اسمزی ماهی و چگونگی شکل‌گیری ساختارهای دخیل در آن از جمله تکوین یونوسیت‌های آبشش و پوست برای تصحیح فرآیند رهاسازی به محیط‌های آب شیرین و یا شور ضروری است.

روش کار: رشد و نمو عملکرد تنظیم اسمزی آبشش و توزیع و تراکم سلول‌های یونوسیت پوست لاروهای ماهی سوف سفید دریای خزر از روز اول تا روز یازده پس از تفریح با استفاده از مطالعه بافت‌شناسی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین و ایمونوهیستوشیمی به وسیله مکان‌یابی آنزیم  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: رشد و نمو فیلامنت‌ها از روز چهارم پس از تفریح آغاز شد، در حالی که سلول‌های یونوسیت واجد ایمونوفلورسانس در آن‌ها مشاهده نگردید. ایمونوفلورسانس ضعیفی از جانب سلول‌های یونوسیت واقع بر فیلامنت‌ها در روز هشتم مشاهده شد. نخستین جوانه‌های لاملا در روز یازدهم با ایمونوفلورسانس بسیار ضعیف، ظاهر شدند. عمده پراکنش یونوسیت‌های پوست تا روز 8 پس از تفریح در ناحیه غشای کیسه زرده بود و پس از آن تا روز یازدهم به سمت ناحیه شکمی انتهای بدن گرایش پیدا نمود. تعداد و سطح اشغال شده توسط یونوسیت‌ها در پوست از روز اول تا 11 روز بعد از تفریح افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: در لارو سوف سفید دریای خزر رشد و نمو کامل عملکرد تنظیم اسمزی آبشش تا سن یازده روزگی انجام نشده و تنظیم اسمزی تا این سن عمدتاً برعهده یونوسیت‌های پوست است.

واژه‌های کلیدی: تنظیم اسمزی، دریای خزر، سوف سفید،  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.

#### مقدمه

تکثیر و نمو ماهیان در آب شیرین و شور با چالش‌های فیزیولوژیکی مواجه است که تنظیم اسمزی در آن صورت می‌پذیرد (21). در مراحل اولیه رشد و نمو ماهیان که اندام‌های ویژه تنظیم فشار اسمزی و از جمله آبشش‌ها جهت انجام تبادلات املاح هنوز به میزان لازم و کافی به تکامل نرسیده‌اند، پوست در کنار سایر وظایف فیزیولوژیک خود یعنی حفاظت، تنفس و ترشح (دفع)، وظیفه کمک به تنظیم فشار اسمزی را نیز برعهده دارد و این وظیفه را با استفاده از سلول‌های کلراید موجود در اپیدرم خود انجام می‌دهد. ساختار سلولی و مکانیزم عملکرد فیزیولوژیک سلول‌های کلراید پوست (یونوسیت‌ها) مشابه ساختار و عملکرد سلول‌های کلراید آبشش می‌باشد (33). این

تنظیم اسمزی مکانیسمی است که هموستازی مایعات درون بدن را حفظ می‌کند و مسئول کنترل اسمولاریته یا فشار اسمزی پلاسما می‌باشد (10). در ماهی‌های بالغی که جزو تنظیم‌کنندگان اسمزی محسوب می‌شوند، توازن آب و مواد معدنی عمدتاً برعهده آبشش‌ها، دستگاه گوارش، کلیه، پوست و تحت کنترل سیستم نورواندوکرین می‌باشد. آبشش مکان اصلی فرآیندهای نقل و انتقال یون و آب در محیط آبی است، زیرا بزرگ‌ترین سطح نفوذپذیر را در ماهی دارد و به دلیل داشتن اپی‌تلیوم ویژه و ارتباط مستقیم با محیط پیرامون، مهم

توانایی تنظیم یونی و اسمزی به میزان تکوین آنتوژنیک اندام‌های درگیر در این فرآیند به‌خصوص آبشش، نیز بستگی دارد (33). درخصوص رشد و نمو سلول کلراید آبششی در مار ماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) (27) فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) (7)، ماهی Killi fish (*Fundulus heteroclitus*) (12) مطالعاتی صورت گرفته است. همچنین مکان‌یابی آنزیم NKA در آبشش مراحل لاروی سیم دریایی بزرگ سر (*S. aurata*) با هدف یافتن زمان شروع عملکرد آبشش به منظور تنظیم اسمزی توسط Bodinier و همکاران (2010) انجام شده است. مکان‌یابی آنزیم NKA به‌وسیله آنتی بادی‌ها در مطالعات ایمونوهیستوشیمی به عنوان شاخصی برای شناسایی سلول‌های کلراید (یونوسیت‌ها) به کار می‌رود (8، 11، 15، 20، 22). ماهی سوف سفید (*S. lucioperca*) از ماهیان مهم اقتصادی دریای خزر می‌باشد که به دلیل کاهش ذخایر آن در سال‌های اخیر، تکثیر نیمه مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان آن برای احیای نسل به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر انجام می‌گیرد. مطالعه درمورد تنظیم اسمزی و چگونگی شکل‌گیری ساختارهای دخیل در آن ماهی از جمله مطالعاتی است که برای تصحیح فرآیند رهاسازی به محیط‌های آب شیرین و یا شور ضروری است. وجود ابهامات فراوان درمورد روند تکامل ساختاری آبشش و پوست و نقش تنظیم اسمزی آن‌ها در مراحل اولیه رشد و نمو سوف سفید سبب شد تا تحقیق حاضر درمورد نقش تنظیم اسمزی سلول‌های یونوسیت (کلراید) پوست در مرحله لاروی و شناسایی و مکان‌یابی سلول‌های کلراید در پوست و آبشش و نقش فیزیولوژیک آن‌ها در تنظیم اسمزی این گونه انجام گیرد. هدف از این مطالعه مکان-یابی آنزیم NKA و تعیین موقعیت و میزان حضور سلول‌های کلراید در پوست و آبشش در مراحل اولیه لاروی (از روز 1 تا روز 11 پس از تفریخ) به منظور یافتن ارتباط

سلول‌ها حاوی مقادیر فراوانی از آنزیم  $Na^+ - K^+$  ATPase (NKA) می‌باشند. این آنزیم در تمام سلول‌های بدن وجود داشته، اما میزان حضور آن در سلول‌های کلراید آبشش و پوست به‌ویژه در غشای قاعده‌ای-جانبی بسیار زیاد است و نقشی حیاتی در تبادل یون‌ها و تنظیم اسمزی ایفا می‌کند (35). اهمیت پوست در فرآیند دفع یون کلر برای اولین بار توسط Shelbourne (1957) در بدن لارو کفشک ماهی (*Pleuronectes platessa*) گزارش شد (28). Threadgold و Lasker نیز در سال 1968، حضور یونوسیت‌ها در پوست لارو ماهی ساردین (*Sardinops caerulea*) را برای نخستین بار گزارش نمودند (19). از آن به بعد مطالعه درمورد حضور سلول‌های کلراید غیر آبششی یا همان یونوسیت‌های پوستی در مراحل لاروی و توزیع و تراکم آن‌ها در نقاط مختلف پوست بدن لارو در تعداد زیادی از ماهیان استخوانی از جمله ماهی آنچوی (24)، ماهی *Plecoglossus ayu*، ماهی *altivelis*، فلاندر دریایی (*Kareius bicoloratu*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (9)، شگک ماهی (C) (34)، تیلاپای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) (1، 30)، کفشک ماهی (*Paralichthys olivaceus*) (7)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (26)، باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (31)، در سیم دریایی بزرگ سر (*Sparus aurata*) (3)، ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) (5) گزارش شده است. در بیشتر این مطالعات پوست به عنوان جایگاه اصلی تنظیم اسمزی در مراحل اولیه رشد و نمو ماهی عنوان شده و پراکنش یونوسیت‌ها عمدتاً بر روی تنه، کیسه زرده، سر و باله‌ها ذکر گردیده است (33، 4)، اما تنوع در مکان حضور، تراکم و پراکنش سلول‌های مذکور در بدن لاروهای گونه‌های مختلف نشان داده است که تراکم و توزیع یونوسیت‌ها می‌تواند بین گونه‌های مختلف ماهی‌ها متفاوت باشد. از سوی دیگر،

برش‌ها بر روی لام‌های پلی-ال لیزین قرار گرفتند سپس توسط گزین پارافین زدایی شده و در سری افزایشی الکل آب‌گیری شدند. آن‌گاه به ترتیب 10 دقیقه در محلول S1 (محلول 3 قرص PBS (Phosphate Buffer Saline) در 1500 سی‌سی آب مقطر با pH= 7/3، 10 دقیقه در محلول S2 (250 سی‌سی از محلول S1 + 2/18 گرم NaCl + 40 میکرولیتر Tween 20 با pH= 7/3، 20 دقیقه در محلول S3 (150 سی‌سی از محلول S1 و 750 میلی‌گرم Regiler) قرار داده شدند. سپس لام‌ها به مدت 1 دقیقه در محلول S1 آب کشیده شده و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب طوری قرار داده شدند که برش‌ها به طرف بالا باشد. روی هر لام 100 میکرولیتر از آنتی بادی IgGα5 رقیق شده در محلول S4 (500 میکرولیتر IgGα5 + 500 میکرولیتر محلول S4 (2 سی‌سی S3 + 8 سی‌سی آب)) اضافه گردید و به مدت 2 ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس لام‌ها به مدت 2 دقیقه در محلول S1 آب کشی شده و 2-3 قطره آنتی بادی FITC (985 میکرولیتر محلول S4 + 15 میکرولیتر آنتی بادی دوم) روی هر لام اضافه شده و یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگهداری شدند. سپس لام‌ها 2 بار در محلول S1 به مدت 2 دقیقه آب-کشی شده و با استفاده از مایع مونتاز، مونتاز شدند. جهت پی بردن به درستی کارکرد این آنتی بادی، به تعدادی از لام‌ها آنتی بادی اول اضافه نشد درحالی که آنتی بادی دوم اضافه گردید (لام‌های ایمونوهیستوشیمی شاهد) بنابراین این لام‌ها نباید فلورسانسی نشان بدهند. کلیه لام‌ها بعد از قرار دادن لام‌ها در جعبه‌های مخصوص چیده شده و برای حفظ خواص فلورسانسی در جای تاریک نگهداری شدند. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس Nikon (TE, 2000S) با فیلترهای 450-490 nm مشاهده و از آن‌ها عکس برداری به عمل آمد (18، 17، 16، 14). شمارش سلول‌های یونوسیت پوست در

بین بزرگ‌تر شدن لارو با تعداد و اندازه سلول‌های یونوسیت پوست و زمان ظهور فیلامنت، لاملا و عملکرد فیزیولوژیک آن‌ها در تنظیم اسمزی بوده است.

### مواد و روش‌ها

200 عدد لارو تازه از تخم خارج شده حاصل از تکثیر نیمه مصنوعی یک جفت مولد سوف سفید متعلق به نیمه جنوبی دریای خزر در بهار سال 1390 از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی دکتر یوسف‌پور سیاهکل تهیه و به ایستگاه تحقیقاتی تخصصی تغذیه و غذای زنده آبزیان (ساحل غازیان) وابسته به پژوهشکده آبرزی پروری آب‌های داخلی کشور (بندر انزلی) منتقل گردیدند. لاروها تحت شرایط کنترل شده در وان حاوی آب چاه جریان دار تصفیه و هوادهی شده نگهداری شدند. دما، اکسیژن و pH آب در طی مدت آزمایش ثبت می‌گردید. از لاروهای متعلق به روزهای اول، چهارم، هشتم و یازدهم پس از تفریح، نمونه برداری شد (14). در هر دفعه نمونه برداری به‌طور تصادفی تعداد 6 لارو صید و برای عملیات بافت‌شناسی در بوئن تثبیت گردید. پس از 24 ساعت نمونه‌ها از محلول بوئن خارج و در الکل 70٪ شستشو و نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها از مراحل آنگیری با درجات مختلف الکل، شفاف سازی، پارافینه شدن، قالب‌گیری، برش، رنگ‌آمیزی (هماتوکسیلین و ائوزین) و مونته کردن عبور داده شدند (2). برش از ابتدا تا انتهای بدن هر لارو با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری و با ضخامت 4 میکرون صورت گرفت. مطالعات تکامل ساختاری در آبشش و شمارش سلول‌های یونوسیت پوست با استفاده از لام‌های بافت‌شناسی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و میکروسکوپ نوری انجام گرفت (15، 14). برای مکان-یابی ایمن‌یابی آنزیم NKA (نشان‌گر سلول‌های کلراید یا یونوسیت) و شناسایی سلول‌های یونوسیت، از آنتی-بادی IgGα5 استفاده شد. برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی،

بیشترین تراکم سلول یونوسیت و شدت ایمونوفلورسانس در غشای کیسه زرده به خصوص در ناحیه میانی بدن وجود داشت (شکل 3-1). پراکنش یونوسیت های پوست در بدن لارو 4 روزه شبیه به لارو یک روزه بود. چند یونوسیت نیز در اپی تلیوم حفره دهان و سرپوش آبخشی مشاهده شد که واکنش ایمنی با آنتی بادی اول برقرار نکرده و در نتیجه فاقد رنگ ایمونوفلورسانس بودند (شکل 4-1). شدت ایمونوفلورسانس در یونوسیت های پوست ناحیه سر و غشای کیسه زرده در ناحیه میانی بدن بیشتر از سایر نقاط بود (شکل 6-1). در لارو 8 و یازده روزه که کیسه زرده جذب شده بود یونوسیت های IF پوست در تمام نقاط بدن پراکنده شده بودند و بیشترین تراکم یونوسیت و شدت ایمونوفلورسانس در ناحیه میانی و انتهایی بدن وجود داشت (شکل 9-1). وضعیت در لاروهای یازده روزه شبیه 8 روزه ها بود. به علاوه، تراکم یونوسیت و شدت رنگ ایمونوفلورسانس در ناحیه اپی تلیوم حفره دهان نسبت به 8 روزه ها بیشتر بود، هم چنین بیشترین تراکم و شدت IF به ناحیه شکمی و انتهای بدن اختصاص داشت (شکل 12-1).

**نتایج شمارش و اندازه گیری سلول های یونوسیت پوست**

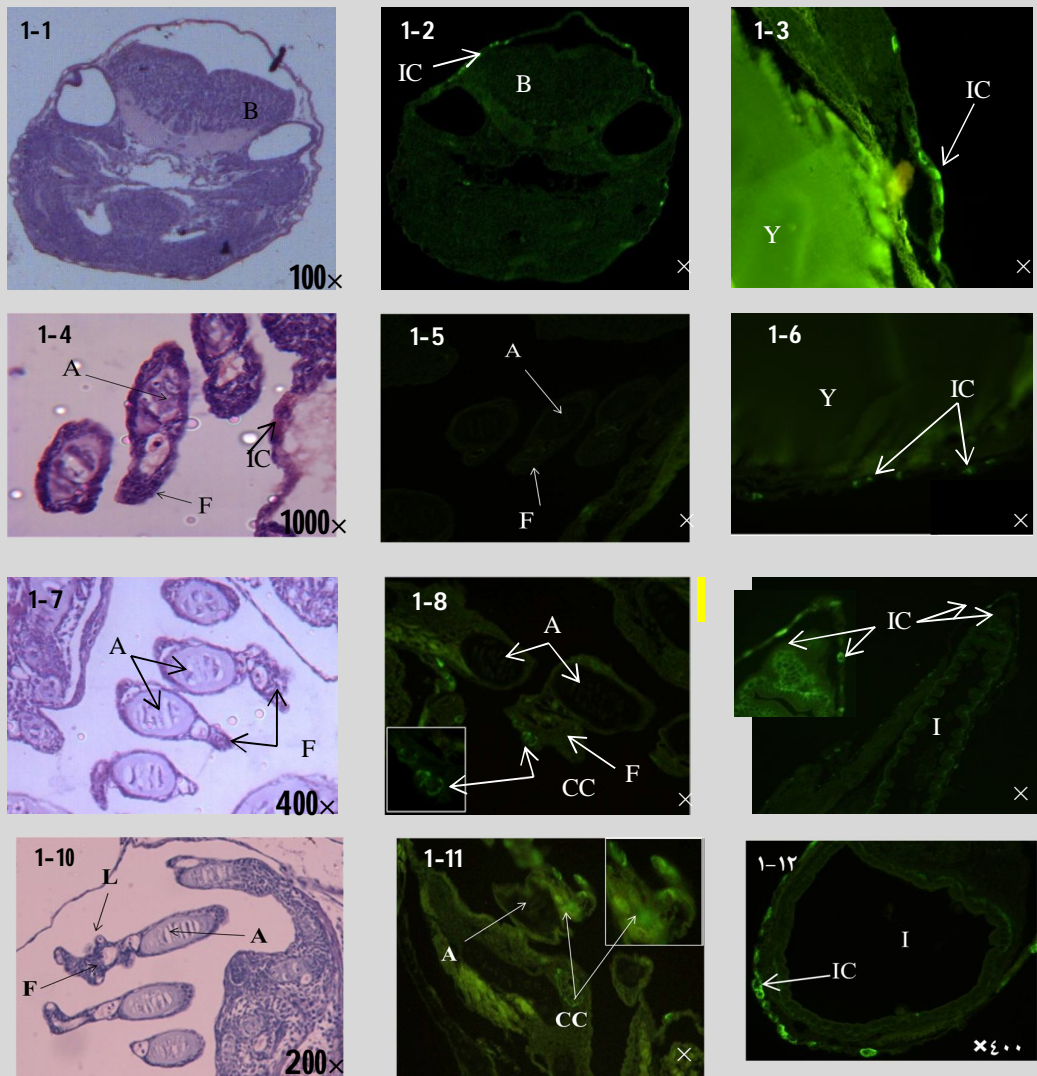
با بزرگ تر شدن لاروها تعداد سلول های یونوسیت در یک میلی متر مربع از سطح پوست افزایش یافت به طوری که در روزهای 8 و 11 پس از تفریح به طور معنی داری بالاتر از روزهای 1 و 4 پس از تفریح قرار داشت ( $p < 0/05$ ) (نمودار 1). درصد سطح اشغال شده توسط یونوسیت ها در 1 میلی متر مربع از مقطع پوست در روز 4 به طور معنی داری بالاتر از روز 1 بود ( $p < 0/05$ ) و تا روز 8 به آهستگی افزایش یافت ( $p \geq 0/05$ ) و سرانجام در روز 11 به طور معنی داری در بیشترین مقدار قرار گرفت ( $p < 0/05$ ) (نمودار 2).

یک میلی متر مربع از سطح پوست در 18 برش عرضی از ابتدا، وسط و انتهای بدن هر لارو انجام و در صد سطح اشغالی توسط سلول های یونوسیت پوست محاسبه و مساحت حداقل 100 سلول در هر لارو اندازه گیری شد. تمام اندازه گیری ها با استفاده از نسخه دوم نرم افزار Image Tool انجام شد (29، 16). تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نسخه 13 نرم افزار SPSS انجام گرفت. نرمال بودن داده ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد سنجش قرار گرفت. در مورد داده های نرمال برای مقایسه داده ها از آزمون آنالیز واریانس و تست دانکن و برای داده های غیر نرمال از آزمون ناپارامتریک Kruskal-Wallis و تست Mann-Whitney U استفاده شد. نمودارها با نرم افزار Excell رسم شدند.

## نتایج

**هیستومورفولوژی آبخش و ایمونولوکالیزاسیون یونوسیت ها در پوست و آبخش های مراحل لاروی**

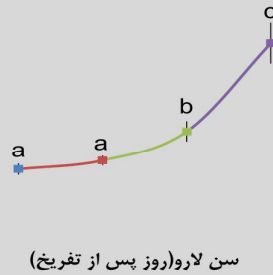
در بررسی ساختار و مراحل رشد و نمو آبخش در لاروهای یک روزه، فیلامنت مشاهده نشد (شکل 1-1). در روز چهارم پس از تفریح، حفره آبخشی همراه با 4 جفت کمان آبخشی و فیلامنت های در حال نمو پدیدار گشت در حالی که سلول های کلراید واجد ایمونوفلورسانس (IF) در آن ها مشاهده نگردید (شکل 5-1). سلول های کلراید IF روی فیلامنت ها در لاروهای هشت روزه ظاهر شدند (شکل 8-1). نخستین جوانه های لاملا و تعداد اندکی سلول های کلراید IF روی فیلامنت ها در لاروهای یازده روزه دیده شد (شکل 10-1 و 11-1). بافت شناسی و مکان یابی آنزیم NKA جهت تعیین توزیع سلول های یونوسیت ایمونوفلورسانس پوست در نقاط مختلف بدن لاروها نشان داد که در لارو یک روزه یونوسیت پوست در مناطق مختلف بدن از جمله رأس سر به خصوص نواحی نزدیک چشم (شکل 2-1) هم چنین پوست ناحیه جوانه باله، غشاء دور تا دور کیسه زرده هم چنین در پشت بدن از ابتدا تا انتهای بدن پراکنده شده اند.



شکل 1- تصاویر بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  از لارو سوف سفید دریای خزر طی دوره رشد و نمو پس از تفریح. (1-1) و (1-2): مقطع عرضی سر لارو یک روزه که فاقد شکاف‌های آبشی است و هیچ سلول یونوسیت واجد ایمونوفلورسانسی (IF) در محدوده دهانی و آبش مشاهده نمی‌شود و چندین یونوسیت IF در پوست سر نزدیک حدقه مشخص‌اند (1-2). (1-3): یونوسیت‌های IF در پوست غشای کیسه زرده از مقطع عرضی بدن لارو یک روزه. (1-4) و (1-5): مقطع عرضی از سر لارو 4 روزه که در آن کمان‌های غضروفی آبشی و فیلامنت‌های درحال رشد مشخص‌اند، چند سلول یونوسیت در اپی‌تلیوم حفره آبشی در رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین اتوزین مشاهده شد (1-4) که با روش ایمونوهیستوشیمی این سلول‌ها ایمونوفلورسانسی نشان ندادند. (1-6): یونوسیت‌های IF در پوست غشای کیسه زرده از مقطع عرضی بدن لارو چهار روزه. (1-7) و (1-8): مقطع عرضی (1-7) و طولی (1-8) سر لارو هشت روزه که چند سلول یونوسیت (کلراید) واجد ایمونوفلورسانس روی فیلامنت در حال نمو مشخص است. (1-9): مقطع طولی لارو 8 روزه و تصویری با بزرگنمایی  $400 \times$  ناحیه انتهایی که یونوسیت‌های IF پوست نواحی پشتی و شکمی در انتهای بدن در آن مشخص است. (1-10) و (1-11): مقطع عرضی (1-10) و طولی (1-11) منطقه سر لارو یازده روزه که با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین اتوزین رشد و نمو جوانه‌های لاملا کاملاً معین است و تصویر ایمونوهیستوشیمی وجود سلول‌های یونوسیت ایمونوفلورسانس را روی فیلامنت در حال نمو نشان می‌دهد. (1-12): تراکم فراوان یونوسیت‌های IF در پوست ناحیه شکمی انتهای بدن مقطع عرضی بدن لارو 11 روزه.

علامت اختصاری: A: کمان آبشی، B: مغز، CC: سلول کلراید آبشی، F: فیلامنت، I: روده، IC: سلول یونوسیت پوست، L: لاملا.

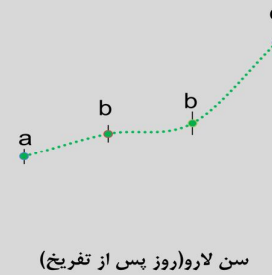
تعداد سلول های یونوسیت در 1mm<sup>2</sup> از سطح پوست



سن لارو(روز پس از تفریخ)

نمودار ۱

درصد سطح اشغال شده توسط یونوسیت ها در 1mm<sup>2</sup> از مقطع پوست



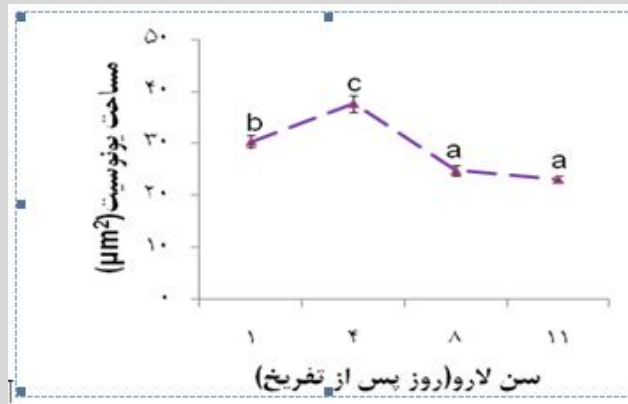
سن لارو(روز پس از تفریخ)

نمودار ۲

نمودار 1 - مقایسه میانگین تعداد سلول های یونوسیت در 1mm<sup>2</sup> از سطح پوست. نمودار 2 درصد سطح اشغال شده توسط یونوسیت ها در 1mm<sup>2</sup> از مقطع پوست لاروهای سوف سفید در روزهای اول، چهارم، هشتم و یازدهم پس از تفریخ در آب شیرین. حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ( $p < 0/05$ ).

سپس تا روز 11 کاهش معنی داری یافت  
(نمودار 3) ( $p < 0/05$ )

میانگین مساحت سلول های یونوسیت پوست (میکرومتر مربع) در روز 4 به طور معنی داری بالاتر ( $p < 0/05$ ) و نسبت به سایر روزها در بیشترین مقدار قرار گرفت و



نمودار 3- نمودار مقایسه میانگین مساحت ( $\mu\text{m}^2$ ) سلول های یونوسیت پوست لاروهای سوف سفید *S. lucioperca* در روزهای اول، چهارم، هشتم و یازدهم پس از تفریخ در آب شیرین. حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ( $p < 0/05$ ).

### بحث و نتیجه گیری

سلول های یونوسیت واجد IF قوی در پوست سر به ویژه نواحی مجاور حدقه چشم، پشت بدن، جوانه باله ها و به تعداد متراکم و با شدت رنگ قوی تر در غشای کیسه زرده در ابتدا و به خصوص در ناحیه میانی بدن مشاهده گردید. عدم مشاهده فیلامنت ها در لاروهای یک روزه سوف سفید دلالت بر عدم رشد و نمو آنها در دوران جنینی این ماهی دارد. بنابراین در سوف سفید مانند سیم

در بررسی آنژیوژنی سلول های یونوسیت (کلراید) تنظیم کننده یونی در بافت آبشش و پوست لارو سوف سفید دریای خزر از طریق مکان یابی ایمن یایی NKA و مطالعه بافت شناسی، در لاروهای یک روزه سوف سفید، فیلامنت آبششی و سلول یونوسیت آبششی واجد ایمونوفلورسانس (IF) مشاهده نشد، اما در همین زمان

کلراید فیلامنت که نشان‌گر آغاز روند برعهده گرفتن عملکرد تنظیم اسمزی در آبشش سوف سفید می‌باشد، در لاروهای 8 روزه مشاهده شد. در باس دریایی (D. labrax) وجود تعداد کمی سلول کلراید IF روی فیلامنت در حال نمو در لارو 6 روزه گزارش شده است (23). در لارو 11 روزه سوف سفید نخستین جوانه‌های لاملا و تعداد اندکی سلول‌های کلراید IF روی فیلامنت‌ها مشاهده گردید. نتیجه به دست آمده درباره ماهی وال آی نشان داد که رشد و نمو لاملا بعد از شروع تغذیه فعال (10 روز پس از تفریخ) رخ داد (25). Katoh و همکاران (2000) در لارو ماهی Killi fish گزارش نمودند که سلول‌های کلراید در زمان تفریخ ایمونوفلورسانس ضعیف داشتند و بیان داشتند که این سلول‌ها احتمالاً نابالغ‌اند ولی به وظایف خود در نقل و انتقال یون‌ها عمل می‌کنند. آن‌ها هم چنین نشان دادند که در 4 روزگی لاملا ظاهر شد و سلول‌های کلراید فیلامنت به خوبی توسعه یافته و با آنتی‌بادی ضد NKA به شدت واکنش ایمنی برقرار نمودند و از این شواهد نتیجه گرفتند که در Killi fish این مرحله نقطه آغاز هردو عملکرد آبشش به عنوان اندام تنفسی و تنظیم‌کننده اسمزی می‌باشد (12). در مورد ماهی مورد مطالعه در تحقیق حاضر هرچند ظهور لاملا در روز 11 پس از تفریخ اتفاق افتاد اما تعداد سلول‌های کلراید فیلامنتی و شدت ایمونوفلورسانس آن‌ها کم بود، بنابراین آشکار شدن سلول‌های کلراید فیلامنتی هرچند با ایمونوفلورسانس کم قدرت نشانه‌ای از آغاز رشد و نمو عملکرد تنظیم اسمزی آبشش است اما تا روز 11 پس از تفریخ رشد و نمو نقش عملکردی تنظیم اسمزی آبشش کامل نشده است و به تدریج و با افزایش سن کامل می‌شود. هم‌زمان با ظهور سلول‌های کلراید ایمونوفلورسانس در فیلامنت‌های در حال رشد و نمو لاروهای 8 تا 11 روزه و نیز آغاز رو به رشد روند عملکردی تنظیم اسمزی در این لاروها،

دریایی (*S. aurata*) (3) و باس دریایی (*D. labrax*) (32)، رشد و نمو آبشش پس از دوران جنینی و در مراحل لاروی انجام می‌شود، اما در مطالعه روی برخی از ماهیان استخوانی نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص شد که شروع رشد و نمو آبشش در دوره جنینی صورت می‌گیرد (6). در تحقیق حاضر، در لاروهای 4 روزه، 4 جفت کمان آبششی و فیلامنت‌های در حال نمو مشاهده گردید که نشان می‌دهد تشکیل شکاف‌های آبششی، سپس تمایز حفره آبششی و به دنبال آن رشد و نمو کمان‌ها و رشته‌های آبششی پس از روز اول لاروی یعنی روز دوم تا چهارم پس از تفریخ اتفاق افتاده است. در تحقیق انجام شده روی ماهی وال آی (*Stizostedion vitreum*)، نشان داده شد که فیلامنت‌های آبشش در روز 3 پس از تفریخ ظاهر شدند (25). علاوه بر این در مطالعه ایمونوهیستوشیمی از لاروهای 4 روزه سوف سفید سلول‌های کلراید واجد IF در آبشش در حال نمو تشخیص داده نشد، در حالی که در پوست سر نزدیک حلقه چشم، باله‌ها و به تعداد بسیار اندک در اپی‌تلیوم حفره دهان و سرپوش آبششی سلول‌های یونوسیت واجد IF با شدت متوسط مشاهده گردید و بیشترین تراکم سلول یونوسیت و شدت IF در غشای کیسه زرده به‌ویژه در نواحی میانی بدن وجود داشت. یعنی وقتی که ساختار آبششی در سوف سفید شروع به تمایز و رشد و نمو نمود سلول‌های یونوسیت پوست هنوز عمده‌ترین مکان نقل و انتقال یونی در بدن لارو بودند. در مطالعه بر روی سیم دریایی هم‌زمان با تمایز حفره آبششی و رشد و نمو کمان‌های آبششی در روز دوم پس از تفریخ سلول‌های کلراید ایمونوفلورسانس در قسمت سقف حفره آبششی نمایان شدند و حضور و تراکم سلول‌های کلراید ایمونوپوزیو تیرا سرانجام در روز 30 پس از هیچ مشاهده و ثبت گردید (3). در بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر اولین نشانه‌های واکنش ایمن‌یایی در سلول‌های

مختلف اهمیت اکولوژیک و فیزیولوژیک برخوردار باشد ولی پیشنهاد شده است که، این پارامترها رابطه نزدیکی با ملزومات مختلف فرآیند تنظیم اسمزی در بدن آن‌ها دارد (33). نتایج شمارش و اندازه‌گیری در مطالعه حاضر نشان داد که تعداد و سطح اشغال شده توسط یونوسیت‌های پوست تا 11 روزگی افزایش داشته است و اندازه یونوسیت‌ها تا 4 روزگی افزایش داشته و پس از آن تا روز 11 بعد از تفریح که کیسه زرده نیز کاملاً جذب شده بود، کاهش داشته است. درقرل آلائی رنگین کمان گزارش شده است که بیشترین تراکم کل یونوسیت‌های پوست تا نیمه‌های مرحله جذب کیسه زرده بود و پس از آن کاهش صورت گرفت (26). در سیم دریایی نشان داده شد که اندازه یونوسیت‌ها از زمان تفریح تا لارو حدود 6 میلی‌متری افزایش و پس از آن تا مرحله جوانی کاهش یافت و تراکم یونوسیت‌ها و درصد سطح اشغال شده توسط آن‌ها در پوست از زمان تفریح تا مرحله جوانی کم شد (32). در مطالعه روی ماهی آزاد دریای خزر مشاهده شد که در روز اول پس از تفریح رشد و نمو یونوسیت‌های آبشش کامل نشد و عمده تراکم یونوسیت‌ها روی غشای کیسه زرده بود، هم‌چنین این نتیجه به دست آمد که با افزایش سن تا روز 9 پس از تفریح و با افزایش تراکم و تکمیل رشد و نمو سلول‌های کلراید آبششی، یونوسیت‌های پوست ناحیه تنه و کیسه زرده کاهش یافتند (5). در فلاندر ژاپنی اندازه و تراکم یونوسیت‌های پوست از زمان تفریح تا مرحله لاروی بعد از متامورفوز کاهش نشان داد و پوست بدن در روز 28 عاری از یونوسیت‌ها شد جز یونوسیت‌های کوچکی که روی باله‌ها باقی مانده بودند (7). بدیهی است که درمشاهدات حاصل از مطالعه روی برخی از گونه‌های یاد شده، بسته به تفاوت موجود در گونه و نیز روزها و سنین در نظر گرفته شده برای مطالعات آنتوزنیک در هر مطالعه، نتایج کم و بیش متفاوتی گزارش شده است. اما

سلول‌های یونوسیت پوست IF در لارو 8 روزه هم‌چنان در پوست سر نزدیک حلقه چشم وجود داشت و به دلیل جذب شدن کیسه زرده، تراکم آن‌ها در پوست ناحیه پشت و شکم گسترش یافت. هم‌چنین تراکم و شدت ایمونوفلورسانس در نواحی میانی و انتهایی بدن بیشتر از ناحیه ابتدایی بدن لاروها متمرکز شده بود. در لاروهای 11 روزه که در آن‌ها هنوز رشد و نمو آبشش کامل نشده است هم بیشترین تراکم یونوسیت و شدت IF به سمت ناحیه شکمی و نیز انتهای بدن تمایل داشت ضمن آن‌که این تراکم و شدت در ناحیه اپی‌تلیوم حفره دهان نسبت به 8 روزه‌ها بیشتر بود. بنابراین در لارو سوف سفید تا روز 11 پس از تفریح تقریباً پوست تمام نقاط بدن کم و بیش واجد یونوسیت‌های بالغی بودند که عملکرد تنظیم اسمزی داشتند. بدین ترتیب مکان عمده حضور یونوسیت‌های فعال در مرحله قبل از جذب کیسه زرده، غشای کیسه زرده به‌ویژه در ناحیه میانی بدن و در مرحله پس از جذب کیسه زرده پوست نواحی شکم و انتهای بدن بود. مناطق ذکر شده در تحقیق حاضر در مورد حضور یونوسیت‌های پوست از جمله نقاط عمده‌ای است که با تراکم‌های متفاوت در مطالعات سایر محققین در گونه‌های مختلف ماهی‌ها مشاهده شده است (33). Varsamos و همکاران (2005) در یک مقاله مروری در مورد آنتوزنی تنظیم اسمزی در ماهیان، با بررسی تحقیقات انجام شده روی لارو گونه‌های مختلفی هم- چون تیلابیای موزامبیک (*O. Mossambicus*)، ماهی ayu یوری هالین، فلاندر دریایی استنوهالین، کپور معمولی آب شیرین، شگ ماهی و باس دریایی که از نظر توزیع یونوسیت‌ها و تراکم آن‌ها در پوست‌شان اختلاف داشتند، بیان نمودند که اختلاف در توزیع و تراکم سلول‌های یونوسیت پوست به گونه وابسته است. آن‌ها هم‌چنین بیان داشتند که معلوم نیست که تفاوت در توزیع و تراکم سلول‌های مذکور در پوست لارو گونه‌های



شدن سلول‌های کلراید آبششی، نقش اصلی تنظیم اسمزی برعهده یونوسیت‌های پوست بود.

### تشکر و قدردانی

از ریاست محترم پژوهشکده آبیاری پروری آب‌های داخلی (بندرانزلی) سرکار خانم دکتر فلاحی، ریاست محترم ایستگاه تحقیقاتی تخصصی تغذیه و غذای زنده آبیان ساحل‌غازیان جناب آقای مهندس دقیق روحی و کارکنان گرمای‌شان، ریاست و کارکنان محترم مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی دکتر یوسف پور سیاهکل هم‌چنین از جناب آقای دکتر خدابنده و سایر عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند کمال تشکر را داریم.

1. Ayson, F. G., Kaneko, T., Hasegawa, S., Hirano, T. (1994). Development of mitochondria rich cells in the yolk sac membrane of embryos and larvae of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and sea water. *Journal of Experimental Zoology*, 270; 129-135.
2. Bancroft, J. D. and Stevens, A. (1977). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Edinburgh London and New York: Churchill Livingstone. P.1-94
3. Bodinier, C., Sucré, E., Lecurieux-Belfond, L., Blondeau-Bidet, E., Charmantier, G. (2010). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 157(A); 220-228.
4. Evans, D.H. (1980). Kinetic studies of ion transport by fish gill epithelium. *American Journal of Physiology*, 238; R224-R230.
5. Ghanizadeh Kazerouni, E., Khodabandeh, S. (2011). Ionocyte immunolocalization and the effects of ultraviolet radiation on their abundance and distribution in the alenins of Caspian Sea salmon, *Salmo trutta caspius*. *Cell Journal (Yakhteh)*, 13(1); 45-54.
6. Gonzalez, M.E., Blanquez, M.J., Rojo, C. (1996). Early gill development in the Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Morphology*, 229; 201-217.
7. Hiroi, J., Kaneko, T., Seikai, T., Tanaka, M. (1998). Developmental sequence of

از مقایسه نتایج این مطالعات و مطالعه بر روی لارو سوف سفید می‌توان دریافت که به دلیل کامل نشدن رشد و نمو عملکرد تنظیم اسمزی در سلول‌های کلراید آبششی در لارو یازده روزه سوف سفید دریای خزر، نقش عملکردی تنظیم اسمزی در لاروهای مذکور تا روز 11 پس از تفریح غالباً برعهده یونوسیت‌های پوست می‌باشد. به‌طور کلی از نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر چنین بر می‌آید که هرچند رشد و نمو عملکردی تنظیم اسمزی در آبشش لاروهای ماهی سوف سفید دریای خزر تا سن یازده روزگی کامل نشد اما در سلول‌های یونوسیت پوست رشد و نمو و قابلیت تنظیم اسمزی با افزایش سن لارو افزایش یافت به‌طوری‌که تا زمان تشکیل لاملا و بالغ

### منابع

- chloride cells in the body skin and gills of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Zoological Science*, 15; 455-460.
8. Hirose, S., Kaneko, T., Naito, Takei, y. (2003). Molecular biology of major components of choride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136; 593-620.
  9. Hwang, P. P., Sun, C. M., Woo, S. M. (1989). Changes of plasma osmolarity, chloride concentration and gill  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$ -ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. *Marine Biology*, 100; 295-233.
  10. Jurd, R. D. (2000). Instant notes in animal biology. *Biological Science Publications*, P.140-145
  11. Kaneko, T. and J. Hiroi. (2008). Osmo and ionoregulation. In: Finn, R.N and Kapoor, B.G. *Fish Larval Physiology*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 163-183.
  12. Katoh, F., Shimizu, A., Uchida, K., Kaneko, T. (2000). Shift of chloride cell distribution during early life stages in seawater-adapted killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Zoological Science*, 17; 11-18.
  13. Khodabandeh, S. (2005). In the gut the zygoptera *Ischnura elegans*, and anisoptera, libellula *Lydia larce* (odonata) activity and immunocytochemical localization. *Zoological Studies*, 45; 53-63.
  14. Khodabandeh S., Charmantier G., Blasco C., Grousset E., Charmantier-Danures M. (2005). Ontogeny of the antennal glands in

- the cray fish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): anatomical and cell differentiation. *Cell Tissue Research*, 319; 153-165.
15. Khodabandeh, S., Charmantier, G., Chramantier-daures, M. (2006). Immunolocalization of  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and post-embryonic development of the lobster, *Homarus gammarus*. *Journal of Crustacean Biology*, 26(4); 515-523.
  16. Khodabandeh, S., Shahriari, M., Abtahi, B. (2009a). Changes in chloride cells abundance  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase immunolocalization and activity in gills of golden grey mullet, *liza aurata* fry during adaptation to different salinities. *Yakhteh Medical Journal*, 11; 49-54.
  17. Khodabandeh, S., Khoshnood, Z., Mosafer, S. (2009b). Immunolocalization of mitochondrial rich cells in the gill urinary system of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* fry. *Aquaculture Research*, 40; 329 – 336.
  18. Khodabandeh, S., Mosafer, S., Khoshnood, Z. (2009c). Effect of cortisol and salinity acclimation on  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}$  cotransporter gene expression and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in gill of Persian sturgeon *Acipenser persicus* fry. *Science Marina*; 111-116.
  19. Lasker, R., Threadgold, L.T. (1968). Chloride cells in the skin of the larval sardine. *Experimental Cell Research*, 52; 582–590.
  20. Lignot, J. H., Nugroho susanto, G., Charmantier- daures, M., Charamantier, G. (2001). Immunolocalization of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in the branchial cavity during the early development of cray fish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell and Tissue Research*, 319; 331-339.
  21. Lin, Y. M., Chen, C. N., Lee, T. H. (2003). The expression of gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in milkfish *Chanos chanos* acclimated to seawater brackish water and freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135; 489-497.
  22. Nebel, C., Romestand, B., Nègre-Sadargues, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Bacal, J., Bonhomme, F. and Charmantier, G. (2005b). Differential freshwater adaptation in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*: involvement of gills and urinary system. *Journal of Experimental Biology*, 208, 3859-3871.
  23. Nebel, C., Boulo, V., Bodinier, C., Charmantier, G. (2006). The  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$  cotransporter in the sea bass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: involvement in osmoregulation. *The Journal of Experimental Biology*, 209; 4908-4922.
  24. O'connell, C. P. (1981). Development of organ systems in the northern anchovy *Engraulis mordax* and other teleosts. *American Zoology*, 21; 429-446.
  25. Phillips, T.A., Summerfelt, R.C. (1999). Gill development of larval walleyes. *American Fish Society*, 128; 162–168.
  26. Rambourgh, P. J. (1999). The gill of fish larvae. Is it primary a respiratory or an ionoregulatory. *Journal of Fish Biology*, 55(A); 186–204.
  27. Sasai, S., Katoh, F., Kaneko, T. and Tsukamoto, K. (2007). Ontogenic change of gill chloride cells in leptocephalus and glass eel stages of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Marine Biology*, 150; 487–496.
  28. Shelbourne, J.E. (1957). Site of chloride regulation in marine fish larvae. *Nature*, 180; 920–922.
  29. Shikano, T., Fujio, Y. (1999). Changes in salinity tolerance and branchial chloride cells of newborn guppy during freshwater and seawater adaptation. *Journal of Experimental Zoology*, 284; 137–146.
  30. Van der Heijden, A.J.H., Van der Meij, J.C.A., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E. (1999). Ultra structure and distribution dynamics of chloride cells in tilapia larvae in fresh water and sea water. *Cell Tissue Research*, 297; 119–130.
  31. Varsamos, S. (2001). L'osmoregulation chez le loup *Dicentrarchus labrax*: adaptation aux variations de salinite' et ontogene'se des me'canismes osmoregulateurs. The'se de doctorat. Universite' Montpellier II, vol. 1 and 2.
  32. Varsamos, S., Diaz, J.P., Charmantier, G., Blasco, C., Connes, R., Flik, G. (2002). Location and morphology of chloride cells during the postembryonic development of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Anatomy and Embryology*, 205; 203–213.
  33. Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G. (2005). Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141(A); 401–429.
  34. Wales, B., Tytler, P. (1996). Changes in chloride cell distribution during early larval stages of *Clupea harengus*. *Journal of Fish Biology*, 49; 801–814.
  35. Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Review*, 77; 591- 625.