Archive of SID

بافت شناسی لوله های کلیوی و مکان یابی ایمونولوژیک آنزیم Na^+, K^+- ATPase در سلول های یونوسیت این لوله ها در بچه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)

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

۱. گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲. بخش بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

چکیده

در این مطالعه سعی شده است تا علاوه بر بافت شناسی لوله های کلیوی بخش دفعی کلیه بچه ماهی هامور به عنوان یک ماهی استخوانی یوری هالین، محل حضور آنزیم Na^+- K^+ ATPase در سلول های یونوسیت این لوله ها با استفاده از روش مکان یابی ایمنیایی این آنزیم تعیین گردد. برای این منظور، نمونه های مورد نظر پس از تهیه در فیکساتیو بوئن فیکس شده و بعد از آبگیری در اتانول، پارافینه شدند. در مرحله بعدی از بلوک ها، برش هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد و برای بافت شناسی از رنگ آمیزی های H&E و PAS استفاده شد. برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی از آنتی بادی های اولیه (IgG 5) و ثانویه (FITC) پس از انجام مراحل آماده سازی استفاده شد. به منظور مشاهده سلول های یونوسیت از میکروسکپ نوری فلوئورسانت با فیلتر های ۴۹۰- ۴۵۰ نانومتر استفاده شد. نتایج بافت شناسی نشان داد که نفرون ها متشکل از گلومرول، لوله های ادراری نزدیک، لوله های ادراری دور و لوله های جمع کننده می باشند. لوله های ادراری نزدیک بواسطه داشتن حاشیه مسواکی (Brush Border) از سایر لوله ها قابل تمیز هستند. در مطالعات ایمونوهیستوشیمی، سلول های یونوسیت بواسطه داشتن مقادیر زیادی از آنزیم Na^+- K^+ ATPase در غشاء قاعده ای- جانبی خود قابل شناسایی هستند. نتایج این مطالعه نشان داد که آنزیم Na^+- K^+ ATPase در بخش قاعده ای- جانبی غشاء سلولی یونوسیت های نفرون ها، بجز در گلومرول، حضور دارد. بنابراین در کلیه ماهی هامور معمولی (E. coioides)، سلول های یونوسیت و به تبع آنها آنزیم Na^+- K^+ ATPase را می توان به روش ایمنیایی مکان یابی کرد.

واژگان کلیدی: *Epinephelus coioides*، بافت شناسی، لوله های کلیوی، سلول های یونوسیت، آنزیم Na^+, K^+- ATPase، مکان یابی ایمنیایی

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: abdir@kmsu.ac.ir .

www.SID.ir

Archive of SID

۱. مقدمه

در حدود ۵٪ از گونه های ماهیان استخوانی، یوری هالین اند. که دارای دامنه تحمل وسیعی نسبت به تغییرات شوری محیط می باشند. این ویژگی در اجداد ماهیان استخوانی وجود داشته و در طول زمان تکامل یافته است (Evans, 1984). تنظیم اسمزی کنترل غلظت الکترولیت ها و مواد آلی حل شده در مایعات بدن و حفظ و نگه داری تعادل آب و نمک هاست (Jurd, 2000). بیشتر گرادیان اسمزی تجربه شده توسط ماهیان در آب دریا اتفاق می افتد، جایی که ممکن است این گرادیان به بالای 600-800 mosmol /kg برسد (Evans DH. and Claiborne G.V., 2006). در این حالت، ماهیان دریایی که آب از دست داده و نمک جذب کرده اند کمبود آب را بواسطه نوشیدن آب و جذب آن در روده جبران می کنند و دفع یون های اضافی را بطور فعال توسط آبشش و کلیه انجام می دهند (Kaneko et al., 2002).

کلیه نقش مهمی در تنظیم اسمزی ماهیان یوری هالین دارد که کنترل خود را از طریق تغییر در میزان ادرار و ایجاد توازن و تناسب بین ترشح و بازجذب یون با توجه به شوری و اسمولالیته محیط آبی اعمال می کن (Flik et al. ,2002). مطالعات نشان داده است اپیتلیوم لوله های کلیوی اغلب ماهیان دارای سلول های یونوسیت (Ionocyte) یا سلول های غنی از میتوکندری هستند که فعالیت بالایی در ترشح یون های دو ظرفیتی و بازجذب یون های تک ظرفیتی دارند. سلول های غنی از میتوکندری لوله های کلیوی مانند سلول های کلراید آبشش، دارای شبکه گسترده ای از فرورفتگی ها در غشائ قاعده ای– جانبی اند که این فرورفتگی ها محل استقرار ناقلین مختلف یونی بویژه پمپ سدیم– پتاسیم حاوی آنزیم Na^+- K^+ ATPase است (مسافر خورجستان و همکاران، ۱۳۸۷). Na^+- K^+ ATPase یک آنزیم غشاء پلاسمایی است که با هیدرولیز ATP سدیم و پتاسیم را بر خلاف شیب غلظت شان جابجا می کند (Grindstaff et al., 1996). ماهی هامور معمولی یک گونه یوری هالین می باشد که بیشتر در مناطق استوایی و نیمه استوایی زندگی می کند (Heemstra and Randall, 1993). این گونه از ماهیان اقتصادی خلیج فارس می باشد که در سایت های تکثیر و پرورش جنوب کشور تکثیر می یابد. این ماهی همچنین دارای میزان صید بالایی در سواحل خلیج فارس می باشد. نظر به تولید و رهاسازی این ماهی در آب های ساحلی و تغییرات شوری لین آب ها در در طی فصول مختلف مانند افزایش شوری به علت تبخیر آب و کاهش آن در طی بارندگی، در این تحقیق سعی شده است تا علاوه بر بافت شناسی لوله های کلیوی به عنوان اندامی مهم در تنظیم اسمزی، آنزیم Na^+- K^+ ATPase که از مهم ترین آنزیم های درگیر در روند تنظیم اسمزی می باشد و بخش عمده ای از انرژی مصرفی در تنظیم اسمزی را به خود اختصاص می دهد و در سمت قاعده ای- جانبی سلول های یونوسیت در لوله های کلیوی مستقر می باشد، با استفاده از روش مکان یابی ایمنیایی این آنزیم مکان یابی شده و نیز به سلول های یونوسیت از سایر سلول ها تمیز داده شوند.

۲. مواد و روش کار

نمونه های مربوط به این تحقیق از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) وابسته به پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور تهیه شدند. بدین منظور تعداد ۱۰ عدد بچه ماهی۳/. ± ۲

www.SID.ir

Archive of SID

گرمی هامور معمولی تهیه و توسط محلول گل میخک بیهوش شدند. در مرحله بعد، سر و قطعه دمی جدا و دستگاه گوارش خارج گردید. سپس نمونه ها به منظور تثبیت به محلول بوئن منتقل و به آزمایشگاه بافت شناسی و جنین شناسی آبزیان دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انتقال داده شدند. نمونه ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از بوئن خارج و برای از بین بردن بقایای رنگ زرد ماده تثبیت کننده چندین بار در الکل ۷۰٪ شستشو داده شدند و برای انجام کارهای بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی، آبگیری نمونه ها با استفاده از سری افزایشی اتانول و در نهایت بوتانول، و به ترتیب ۱ ساعت در الکل ۹۰٪، ۱ ساعت در الکل ۹۵٪، ۱ ساعت در الکل مطلق و ۱۲ ساعت در الکل بوتانول قرار داده شدند. در مرحله بعدی نمونه ها سه مرتبه و هر مرتبه ۳ ساعت در پارافین مایع داخل آون قرار داده شده و قالب گیری شدند (مسافر خورجستان و همکاران، ۸۷). سپس از قالب ها برش هایی سریالی از بخش دفعی لوله های کلیوی به ضخامت ۵ میکرون با استفاده از میکروتوم نیمه دیجیتال LEICA مدل RM2245 ساخت کشور آلمان تهیه گردید. برای مطالعات بافت شناسی لام های مربوطه بوسیله هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند و برای مطالعات هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی از سری برش های تهیه شده برای بافت شناسی استفاده گردید. برای مشخص نمودن حاشیه مسواکی لوله های کلیوی یکسری از لام ها توسط رنگ آمیزی PAS رنگ آمیزی شدند (Tang et al. 2010,). برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی که در آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس واقع در شهرستان نور انجام شد، برش ها پس از تهیه بر روی لام هایی با پوشش Poly- L- Lysin قرار داده شدند و مکان یابی سلول های یونوسیت و آنزیم Na^+- K^+ ATPase بر طبق روش (Khodabandeh et al., 2009a; Khodabandeh et al., 2009b; Khodabandeh et al., 2004; Nebel et al., 2005) انجام شد.

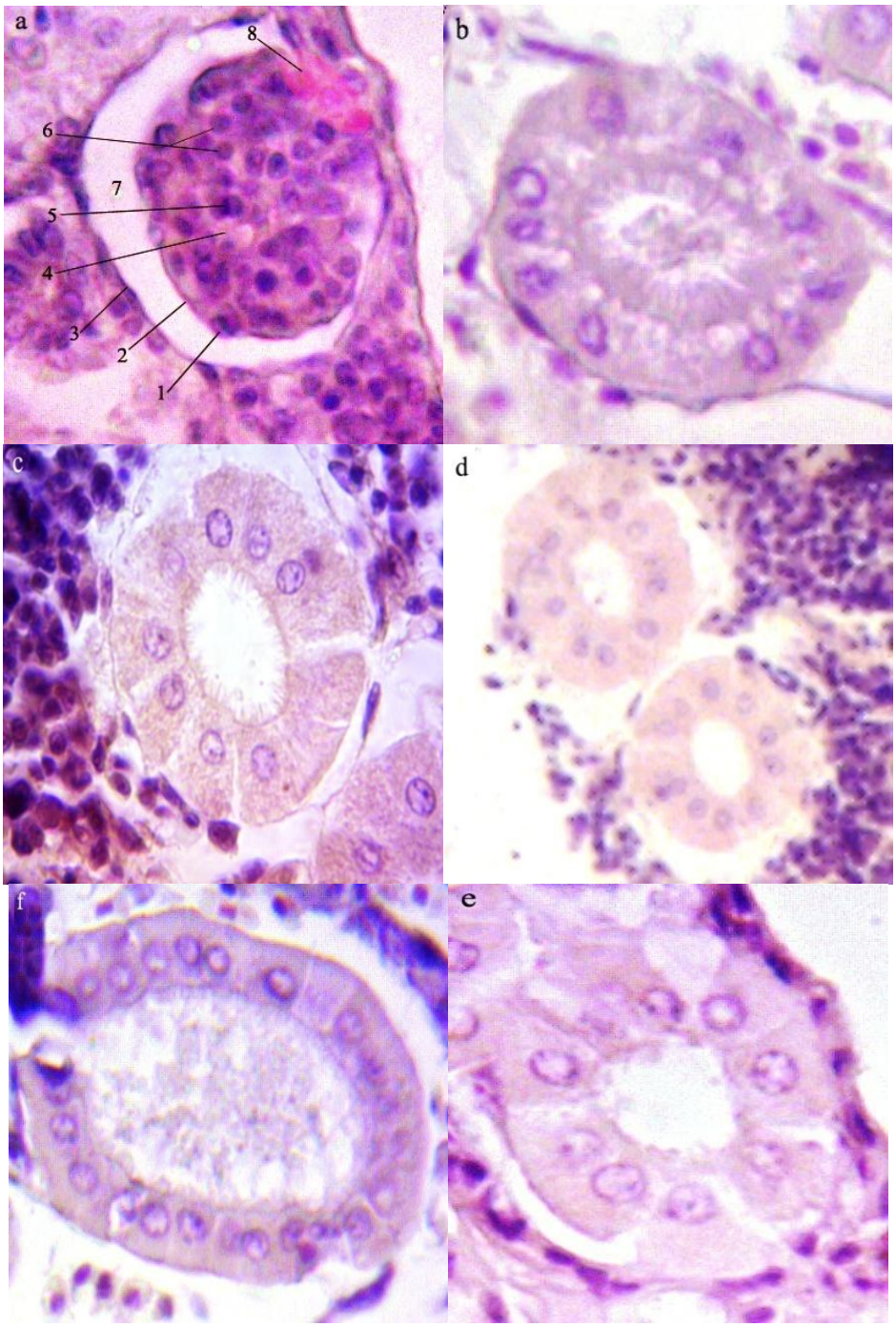
در نهایت مکان یابی ایمنیایی Na^+- K^+ ATPase با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال IgG 5، که به زیرواحد آلفا متصل می شود، توسط میکروسکوپ نوری فلوئورسانس انجام شد. برای این منظور، از لام ها توسط دروبین دیجیتال Olympus متصل به میکروسکوپ فلوئورسنت (Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak 1- Lambda Lamp) با فیلترهای اختصاصی 450 nm -490nm عکسبرداری صورت گرفت.

۳. نتایج

نتایج مطالعات بافت شناسی و هیستوشیمی نشان داد که در ماهی هامور نفرون ها از گلومرول، لوله های ادراری نزدیک، لوله های ادراری دور و لوله های جمع کننده تشکیل شده اند. خود گلومرول متشکل از فضای ادراری (Bowman's space)، سلول های اندوتلیال (endothelial cell)، سلول های مزانژیال (mesangial cell)، اپیتلیوم احشایی کپسول کلیوی (visceral epithelium of the renal capsule) و اپیتلیوم جداری کپسول کلیوی (parietal epithelium of the renal capsule) ، سلول های پودوسیت، پل عروقی، مویرگ ها می باشد (شکل ۱، a). قطعات پروکسیمال I و II نیز دارای سلول های مکعبی با هسته قاعده ای و میکروویلی هایی در رأس می باشند که به داخل لومن کشیده شده اند (شکل ۱، b و c). البته، تعداد آنها از قطعه I به سمت قطعه II کاهش می یابد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. برش عرضی از بخش دفعی کلیه بچه ماهی هامور معمولی. فیکساتیو بوئن، H & E، × 40.

گلومرول شامل بخش های زیر می باشد:

سلول های پودوسیت ۲. اپیتلیوم احشایی کپسول کلیوی ۳. اپیتلیوم جداری کپسول کلیوی ۴. مویرگ های خونی ۵. سلول های اندوتلیال ۶. سلول های مزانژیال ۷. فضای ادراری و ۸. پل عروقی

لوله های ادراری نزدیک (I)

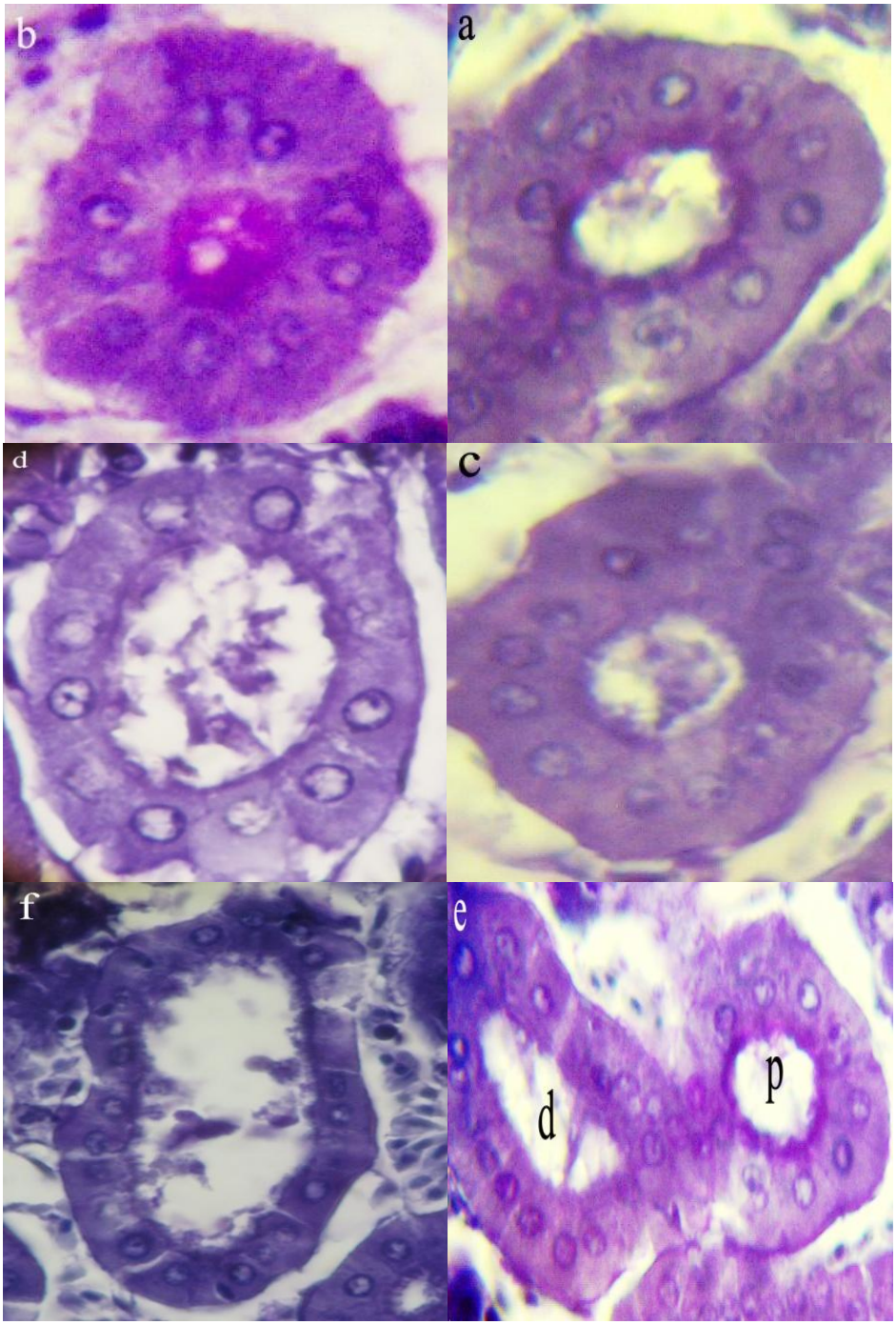
لوله های ادراری نزدیک (II)

d و e. لوله های ادراری دور

f. لوله های جمع کننده ادرار

www.SID.ir

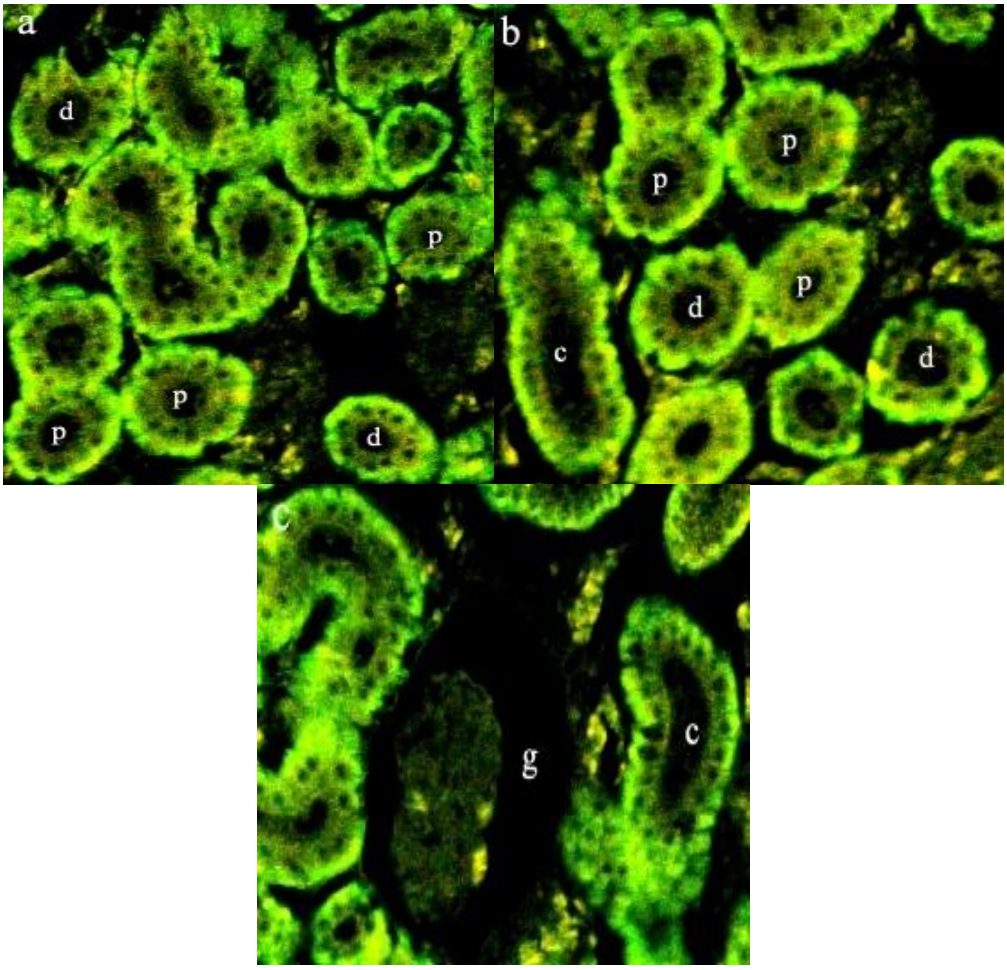
Archive of SID



شکل ۲. برش عرضی بخش دفعی کلیه بچه ماهی هامور معمولی. فیکساتیو بوئن، PAS، × 40
a و b. لوله های ادراری نزدیک I c. لوله های ادراری نزدیک II
d. لوله های ادراری دور e. لوله های ادراری دور و نزدیک و f. لوله های جمع کننده ادرار

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. مکانی یابی سلول های یونوسیت با استفاده از آنزیم Na^{+}- K^{+} ATPase در ساختار نفرون های بخش دفعی کلیه بچه ماهی هامور

a. لوله های ادراری نزدیک و دور b. لوله های ادراری نزدیک، دور و جمع کننده

c. گلومرول و لوله جمع کننده ادرار

روش رنگ آمیزی PAS نشان داد، که لوله های ادراری نزدیک بواسطه داشتن میکروویلی دارای تمایل مثبت به PAS در لومن خود هستند (شکل ۲، a). لوله های ادراری دور دارای سلول های مکعبی بوده و هسته آنها نیز تقریباً گرد و در وسط سلول مشاهده شد. همین طور لومن این لوله ها بدلیل نداشتن حاشیه مسواکی دارای تمایل منفی به PAS بود (شکل ۱، d و e. شکل ۲، b .) لوله های جمع کننده ادرار نیز PAS منفی بوده و بواسطه داشتن سلول های مکعبی، فاقد حاشیه مسواکی و هسته های بیضوی تا گرد و تقریباً میانی تشخیص داده شدند (شکل ۱، f. شکل ۲، c).

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه ایمونوفلئورسانس لام ها نشان داد که آنزیم Na^+- K^+ ATPase در سمت قاعده ای- جانبی سلول های یونوسیت لوله های کلیوی (لوله های ادراری نزدیک، لوله های ادراری دور و لوله های جمع کننده) حضور دارد، اما در گلومرول ها هیچ گونه ایمونوفلوئورسانسی مشاهده نشد (شکل a، b و c). مشاهده لام های شاهد منفی نشان داد که سلول ها هیچ گونه فلوئورسانسی از خود نشان نمی دهند.

۴. بحث

Ogawa در سال 1961 ساختار کلیه ماهیان استخوانی را به ۵ دسته تقسیم بندی کرده است. بر اساس این دسته بندی، کلیه ماهی هامور معمولی شبیه اکثر ماهیان استخوانی دریایی، خصوصیات مورفولوژیکی ای شبیه تیپ ۳ این دسته بندی را نشان می دهد. مطالعات بافت شناسی بخش دفعی کلیه بچه ماهی هامور نشان داد که نفرون ها از گلومرول، لوله های ادراری نزدیک، لوله های ادراری دور و لوله های جمع کننده تشکیل یافته اند. گلومرول دارای بخش هایی مانند فضای بومن، سلول های اندوتلیال، سلول های مزانژیال، اپیتلیوم احشایی کپسول کلیوی و اپیتلیوم جداری کپسول کلیوی می باشد که با رنگ آمیزی H&E و در بزرگنمایی های بالا توسط میکروسکپ نوری قابل تشخیص اند. لوله های ادراری نزدیک دارای سلول های مکعبی و هسته قاعده ای اند و بواسطه داشتن حاشیه مسواکی از لوله های ادراری دور و لوله های جمع کننده قابل تمیز اند (بواسطه رنگ آمیزی PAS). خود لوله های ادراری نزدیک از قطعات I و II تشکیل شده که تعداد میکروویلی در آنها از قطعه I به سمت قطعه II کاهش نشان می دهد و از قطعه II به بعد، یعنی در لوله های ادراری دور و جمع کننده هیچ گونه میکروویلی ای مشاهده نمی شود. ویژگی لوله های ادراری دور داشتن هسته های تقریباً کروی و مرکزی می باشد. هر چند (پوستی، ۱۳۷۳) اظهار داشت که ماهیان آب شور فاقد لوله های ادراری دور می باشند، اما نتایج این مطالعه نشان داد که در ساختار نفرون های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی لوله های ادراری دور نیز حضور دارند که نتایج مطالعه Tang و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی کلیه خامه ماهی مؤید این امر می باشد. لوله های جمع کننده نیز مانند لوله های ادراری دور دارای تمایل منفی نسبت به PAS در لومن خود بوده و بواسطه داشتن سلول های مکعبی، بدون حاشیه مسواکی و هسته های بیضوی تا گرد و تقریباً میانی تشخیص داده می شوند.

نتایج این مطالعه روی کلیه بچه ماهی هامور نشان داد که آنتی بادی (IgG_5) در واکنش با آنزیم Na^+, K^+-ATPase ایمونوفلوئورسانس قابل ملاحظه ای تولید می کند. بنابراین، این آنتی بادی قادر به شناسایی محل حضور سلول های یونوسیت است.

نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نشان داد که آنزیم فوق در غشاء قاعده ای- جانبی توبول های پروکسیمال (قطعات I و II)، توبول های دیستال و توبول های جمع کننده حضور دارد، اما در گلومرول ها وجود ندارد. به عبارت دیگر، آنزیم Na^+, K^+- ATPase حاضر در غشاء قاعده ای- جانبی سلول های یونوسیت توبول ها با آنتی بادی (IgG_5) واکنش ایمنیایی داده و تولید فلوئورسانس می نماید. نتایج مشابهی در مورد دیگر گونه های ماهیان استخوانی، از جمله مطالعه Tang و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی خامه ماهی *(Chanos chanos)* و Lin و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه روی بادکنک ماهی خال سبز *(Tetraodon nigroviridis)* گزارش

www.SID.ir

Archive of SID

شده است. شدت فلوئورسانس مشاهده شده در این مطالعه که بواسطه حضور حضور آنزیم Na^+- K^+ ATPase ایجاد شده است، می تواند نشان از حضور فعال این آنزیم در لوله های های کلیوی به جهت انجام وظیفه تنظیم اسمزی آنها باشد. همین طور تراکم فلوئورسانس در غشاء قاعده ای- جانبی لوله ها، می تواند بر نقش سلول های یونوسیت در تبادلات یونی و نیز توانایی هیپراسمولاریتی در ماهی هامور معمولی دلالت کند.

بنابراین در کلیه ماهی هامور معمولی *(E. coioides)*، سلول های یونوسیت و به تبع آنها آنزیم Na^+- K^+ ATPase را می توان به روش ایمنیایی مکان یابی کرد. با توجه به یافته های این تحقیق که نشان دهنده حضور این آنزیم در غشاء قاعده ای- جانبی یونوسیت های لوله های کلیوی و عدم حضور آن در گلومرول ها می باشد، می توان گفت که سلول های یونوسیت در فرآیندهای حفظ ثبات محیط داخلی بدن جانور به طور قابل ملاحظه ای دخالت دارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد گروه بیولوژی دریای دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر می باشد، که با همکاری صمیمانه آقای جمشید امیری مقدم انجام شده است که از زحمات بی دریغ ایشان نهایت تشکر را داریم. همچنین از زحمات آقای حسینی مسئول آزمایشگاه بیولوژی دریای دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس کمال تقدیر و تشکر را داریم.

منابع

خدابنده ص.، تقی زاده ز. ۱۳۸۵. مکان یابی آنزیم Na+, K+- ATPase و سلول های یونوسیت در آبشش گربه ماهی *Silurusglanis* به روش ایمونوهیستوشیمی، فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۱، صفحات ۵۲- ۴۵.

مسافر خورجستان س.، خدابنده ص.، خوشنود ز. ۱۳۸۷. مکان یابی و بررسی اثر شوری بر نحوه پراکنش سلول های غنی از میتوکندری در توبول های کلیوی بچه تاس ماهی ایرانی، فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره چهارم، صفحات ۲۸۷- ۲۸۰.

پوستی، ا. ۱۳۷۳. بافت شناسی مقایسه ای و هیستوتکنیک. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۵۲۰ ص.

Ogawa M. 1961. Comparative study on the external shape of the teleostean kidney with relation to phylogeny. Scient Rep Tokyo Kyoiku Daigaku B10: pp 61–68.

Evans DH. 1984. The roles of gill permeability and transport mechanisms in euryhalinity. In: Hoar WS, Randall DJ (eds) F. phys. Academic Press, New York: pp 239–283

Heemstra P.C. and Randall, J.E. 1993. 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. No. 125, Vol. 16. Rome, FAO: 382 p.

Grindstaff K. K., Blanco G. and Mercer R. W. 1996. Translational Regulation of Na,K-ATPase α1 and β1 Polypeptide Expression in Epithelial Cells. J. Bio. Chem. 271: 23211–23221.

Caberoy N. B., and Quinitio G. F. 2000. Changes in Na+, K+- ATPase activity and gill chloride cell morphology the grouper *Epinephleus coioides* larvae and juveniles in

www.SID.ir

Archive of SID

response to salinity and temperature. Fish. Physiol and Biochem., 23: 83- 94.

Jurd RD. 2000. Instant Notes in A. Bio. Bios Sci Pub., pp 140-145.

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

Kaneko T., Shiraishi K., Katoh F., Hasegawa S., Hiroi J. 2002. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. Fisheries. SC. 68: pp 1–9.

Khodabandeh S., Kutnik M., Aujoulat F., Charmantier G., Charmantier- Daures M. 2004. Ontogeny of the antennal gland in the crayfish *Astacuslep todactylus* (Crustacea, Decapoda): Immunolocalization of Na+, K+- ATPase. Cell Tissue Res. 319: pp 167- 174.

Lin C.H., Tsai R.S., and Lee T.H. 2004. 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. and Physiol., Part A 138: 287– 295.

Nebel C., Negre-Sadargues G., Blasco C., and C. Charmantier G. 2005. Morphological ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrachus labrax*. Anat. Embryo., 209: pp 193- 206.

Evans D.H., Claiborne G.B. 2006. The physiology of fishes (third edition). CRC press. Pp 186- 187.

Khodabandeh S., Shahriari Moghaddam 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 Med. J., 11: pp 49-54.

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

Tang C. H., Wu W. Y., Tsai S. C., Yoshinaga T., and Lee T. H., 2010. 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 B, 180: 813–824.

www.SID.ir