Archive of SID

مطالعه تکامل ساختاری کلیه و نقش تنظیم اسمزی آن در مراحل اولیه رشد و نمو ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius*

مرجان ضیایی[۱]، صابر خدابنده[۲*]، بهروز ابطحی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
۲. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
۳. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

چکیده

آزاد ماهی خزر *Salmo trutta caspius* یک ماهی یوری هالین و قادر به تحمل نوسان‌های وسیع شوری در مراحل بلوغ با استفاده از چند سازگاری ریخت-عملکردی می باشد. درخصوص کلیه این گونه بومی خزر که نقش مهمی در تعادل یون و مایعات بدن دارد اطلاعات کمی وجود دارد. در بررسی حاضر اونتوژنی (روند رشد و نمو) سیستم کلیوی (کلیه و کیسه ادراری) از نظر ساختاری و عملکرد تنظیم اسمزی از روز اول تفریخ تا روز ۲۷ از طریق بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در روز اول پس از تفریخ، کلیه پرونفروسی موجود است که در طول بدن و کنار لوله گوارش واقع شده است. تا روز ششم، توبولهای پرونفریک پیچیدگی کم داشت و در روزهای بعدی رشد و نمو، تمایز، تعداد و پیچیدگی آنها افزایش یافت. توبولهای مزونفروسی به صورت توده‌های سلولی تیره رنگ از روز ششم ظاهر شدند. گلومرول از روز ۱۲ پس از تفریخ ظاهر شد و دارای سلول‌های مزانشیال, خونی و کپسول بومن بود. در فاصله بین روزهای ۱۶ تا ۲۲ بر تعداد توبولهای مزونفریک افزوده شد، به طوری که بافت خونی بین آنها کاهش یافت و تمام فضای کلیوی را توبولها احاطه کردند. در روزهای بعد تشکیل کلیه مزونفروسی با کاهش بافت خونی و توبولهای پرونفروسی مشاهده شد. مکان‌یابی آنزیم Na+/K+ ATPase در لارو یک روزه نشان داد که اغلب بخشهای کلیه پرونفروسی دارای خاصیت ایمونوفلورسانس قوی و به عبارتی مقدار زیادی از این آنزیم در قسمتهای قاعده‌ای خود می‌باشند. با رشد لارو، شدت ایمونوفلورسانس در بخشهای مختلف کلیه با تغییرات مشخصی همراه بود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که تا زمان تشکیل مزونفروس، نقش اصلی تنظیم اسمزی برعهده توبولهای پرونفروسی است و در مراحل بعدی رشد و نمو این نقش به توبولهای مختلف مزونفروسی منتقل می‌شود.

واژگان کلیدی: کلیه، گلومرول، تنظیم اسمزی، Na^+/K^+-ATPase، *Salmo trutta caspius*.

*نویسندهٔ مسؤول مقاله، پست الکترونیک: surp78@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

یکی از عوامل اساسی در بقا، پراکنش و متابولیسم آبزیان، شوری و تغییرات آن است که در مراحل مختلف زندگی با توجه به توانایی تنظیم اسمزی آن آبزی، بقا و سازش پذیری‌اش را تأمین می‌کند (Varsamos *et al.*, 2005). ماهیان یوری هالین قادر به کنترل آب و مایعات بدن خود با استفاده از مکانیسمهای مختلف تنظیم اسمزی (تنظیم هیپر و هیپواسموتیک) براساس شوری محیط خارجی هستند. البته توانایی تنظیم یونی و اسمزی علاوه بر گونه به میزان تکوین اونتوژنیک اندام‌های درگیر در فرایند تنظیم نیز بستگی دارد(Semennova *et al.*, 2000). آبشش، پوست، کلیه و روده از اندام‌های اصلی تنظیم اسمزی در ماهیان بوده که براساس گونه و شرایط زیستی آن, زمان تکوین و رشد و نمو آن در مراحل ابتدایی زندگی متفاوت می‌باشند و در طول اونتوژنی از نظر مورفولوژیک، عملکردی و فیزیولوژیک بتدریج تکامل یافته و ماهی را با نوسانهای شوری هماهنگ و سازگار می‌سازند (Varsamos *et al.*, 2005). تنوع قابل توجهی در اونتوژنی لاروهای گونه‌های مختلف وجود دارد (Power, 2005). با آن‌که افزایش یا تغییر در ظرفیت تنظیم اسمزی به طور خطی مطابق با زمان نیست در مراحل مشخصی پیش می‌رود که در بعضی از گونه‌ها با باز شدن دهان یا انتقال لارو- جوان و در دیگران با رخدادهایی خاص در چرخه زندگی‌شان همچون انتقال پار- اسمولت مرتبط می‌باشد (Varsamos *et al.*, 2005). معمولاً لاروهای ماهیان بلافاصله پس از تفریخ قادر به زندگی در محیطی‌اند که شوری/ اسمولالیته متفاوتی نسبت به اسمولالیته خونشان دارد. تحمل شوری لاروها به توانایی تنظیم اسمزی آنها بستگی دارد (Varsamos *et al.*, 2005). در گونه‌های آب شیرین، تنظیم هیپراسموتیک رخ می‌دهد و اسمولالیته خون آنها (حدود ۳۰۰ Mosm/kg) نسبت به محیط اطرافشان (کمتر از ۱Mosm/kg) بالاتر است. لذا آنها در معرض هجوم آب و از دست دادن یون‌ها بوده که عملکرد سیستم کلیوی در آنها دفع آب اضافی از طریق تشکیل ادرار رقیق و هیپوتونیک و به دست آوردن اکثر نمکها به وسیله اپیتلیای آبششی و همچنین یون‌های فیلتر شده در کلیه از طریق جذب فعال می‌باشد (Hickman, 1969; Curtis and Wood; 1991; Nihimura and Imai, 1982). کلیه در مهره‌داران از اندام‌های اصلی در حفظ هومنوستازی مایعات بدن است و مورفولوژی و عملکرد آن با توجه به نیازهای فیزیولوژیک و براساس گونه متفاوت است و انواع مختلفی از کلیه در ماهیان یافت شده است (Hentschel and Elger, 1987). ساختار کلیه و جزئیات آن به وسیله الگر و همکاران در سال ۲۰۰۰ به طور وسیع مطالعه شده است (Elger *et al.*, 2000). از نظر جنین‌شناسی کلیه در ماهیان استخوانی شامل رأس (پرونفروس) و بدنه (مزونفروس) می‌باشد که پرونفروس کلیه ابتدایی و اولیه در جنین و لارو ماهیان است و طی اونتوژنز به مزونفروس تبدیل می‌شود که با توجه به گونه و شرایط فیزیولوژیک آن، زمان ظهور گلومرول و تشکیل کلیه مزونفروسی متفاوت می‌باشد (صیاد بورانی ۱۳۵). واحد ترشحی ادرار در ماهیان شامل دو قسمت جسمک کلیه و مجاری کلیوی است که بسته به محیط زندگی و گونه ماهیان می‌تواند متفاوت باشد. در ماهیان آب شیرین، جسمک کلیه خود دارای گلومرول و کپسول بومن است و مجاری شامل بخش گردنی, لوله‌های پیچیده دور و نزدیک است که این قسمت‌ها نیز در طول اونتوژنز تمایز یافته و زمان ظهور آنها به میزان سرعت تکوین و تشکیل کلیه بستگی دارد (Nebel *et al.*, 2005). تنظیم اسمزی در ماهیان استخوانی بالغ بسیار مطالعه شده اما در مورد لاروها اطلاعات کمی وجود دارد. براساس مطالعات وارساموس در سال ۲۰۰۱، مشخص شده است پیش لارو ماهی بس دریایی در زمان تفریخ قادر به تنظیم اسمزی بوده و در طول رشد و نمو بر ظرفیت تنظیم اسمزی آن افزوده می‌شود که با تکوین و رشد و نمو اندام‌های درگیر در تنظیم اسمزی همراه است (Varsamos *et al.*,

www.SID.ir

Archive of SID

2001). مطالعه اونتوژنی تنظیم اسمزی در مراحل اولیه لاروی و زمان تشکیل و تکوین اندام‌های مؤثر در آن می‌تواند زمان مناسب مهاجرت به دریا را مشخص کند و به نظر می‌رسد نتایج تحقیقاتی همچون تحقیق حاضر، بتواند راهکارهای عملی را در تعیین زمان مناسب رهاسازی برای افزایش ضریب بازگشت شیلاتی ماهیان اقتصادی و با اهمیت در صنعت شیلات ارائه دهد.

ماهی آزاد خزر از خانواده آزاد ماهیان با نام علمی *Salmo trutta caspius* از جمله ماهیان مهاجر دریای خزر است که مراحل اولیه رشد و نمو جنینی و بعد از جنینی تا به دست آوردن توان تنظیم اسمزی دریای خزر را در آب شیرین رودخانه‌ها طی می‌کند (صیاد بورانی، ۱۳۸۵).

بچه ماهیان این گونه با تغییر شکل از پار به اسمولت برای زندگی در دریا مهیا می‌شوند و این تغییر شکل با تغییرات ساختاری, فیزیولوژیک, بیوشیمیایی و مورفولوژیک همراه است و به طور فصلی اتفاق می‌افتد و در یک دوره ۱-۲ ماهه توسعه یافته، ماهیان را برای مهاجرت به پایین دست رودخانه و ساکن شدن در دریا سازگار می‌کند (صیاد بورانی ۱۳۸۵). لذا با مطالعه تغییرات ساختاری و عملکردی فشار اسمزی و به کارگرفتن نتایج و یافته‌های آن می‌توان تغییرات ناشی از عوامل محیطی همچون شوری و آلاینده‌ها را بر آن تخمین زده و به اثرات این عوامل بر رشد و نمو این گونه مهم اقتصادی پی برد. لذا در این تحقیق اونتوژنی کلیه و عملکرد تنظیم اسمزی آن در مراحل اولیه لاروی یعنی از روز اول پس از تفریخ تا روز ۲۷ مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌کار

تخم‌های چشم زده در دی ماه ۱۳۸۵ از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی شهید باهنر واقع در کلاردشت استان مازندران به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل گردید. نمونه‌ها تحت شرایط کاملاً کنترل شده با دمای ۱۰-۱۲°C و pH= ۸/۵ و سیستم آب جریان‌دار هوادهی شده و تصفیه کننده نگهداری شدند. شاخص‌های دما و pH و اکسیژن آب هر روز اندازه‌گیری شدند. از اولین روز تخمه‌گشایی، هر سه روز یک بار ۶ نمونه گرفته شده و برای آزمایشهای بافت‌شناسی در محلول بوئن تثبیت شدند (Khodabandeh *et al*., 2005). نمونه‌ها بعد از ۲۴ ساعت از محلول بوئن خارج و با الکل اتانول ۷۰٪ شستشو شدند. این کار در چندین نوبت انجام گرفت تا رنگ زرد بوئن کاملاً از روی نمونه‌ها شسته شود. سپس برای آبگیری به ترتیب در الکل ۹۰٪ (یک ساعت), الکل ۹۵٪ (یک ساعت)، الکل ۱۰۰٪ (یک ساعت) و نهایتاً ۱۲ ساعت در الکل بوتانل قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها سه نوبت ۴ ساعته داخل پارفین مایع واقع در آون قرار گرفتند و در پایان قالب‌گیری شدند. از قالب ها به وسیله دستگاه میکروتوم برشهایی به ضخامت ۵ میکرون از ابتدا تا انتهای بدن لارو تهیه شد و روی لامها با پوشش Poly-L-lysin قرار داده شدند. برای مطالعه ساختاری بافت‌شناسی اندامها، لام‌ها به وسیله هماتوکسین- فوشین رنگ‌آمیزی و به وسیله میکروسکوپ نوری مطالعه شدند (Khodabandeh et al., 2005; Martoja and Martoja Pierson, 1967).

ایمونولوکالیزه کردن آنزیم Na^+/K^+-ATPase با استفاده از آنتی‌بادی IgGα5 و میکروسکوپ نوری فلورسانس انجام گرفت. برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، لامها بعد از پارافین زدایی در گزیلن و آبگیری در الکل اتانول به ترتیب ۱ دقیقه در محلول PBS، ۱۰ دقیقه در محلول A (۴۰۰cc PBS ده میلی‌مول +g ۳/۵ کلرید سدیم) و ۵ دقیقه در محلول B (۵۰٪ PBS و۵۰٪ Regiler) قرار داده شدند. سپس لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در PBS آب

www.SID.ir

Archive of SID

کشیده شده و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب به طوری که سطح دارای برش‌ها به طرف بالا باشد، چیده شدند. روی هر لام ۲-۳ قطره از آنتی‌بادی(اول) IgGα۵ رقیق شده در PBS اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از سپری شدن این دو ساعت، ۲-۳ قطره از آنتی‌بادی (دوم) FITC۱ روی هر لام اضافه شد و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شدند. سپس لام‌ها در PBS آب کشیده شده و با استفاده از مایع مونتاژ، مونتاژ شدند. برای پی‌بردن به درستی کارکرد این آنتی‌بادی به تعدادی از لامها آنتی‌بادی اول اضافه نشد اما آنتی‌بادی دوم اضافه شد، لذا این لام ها نباید فلورسانسی داشته باشند. تمام لام‌ها بعد از قراردادن لامل روی آنها در جعبه-های مخصوص چیده شده و برای حفظ خواص فلورسانسی در جای کاملاً تاریک نگهداری شدند.

لامها به‌وسیله میکروسکوپ نوری فلورسانس Leitz Diaplan Coupled Ploemopak 1-Lambda Lamp با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ nm مشاهده و از آنها عکسبرداری شد (Khodabandeh *et al*., 2005; Khodabandeh, 2006 and 2007; Lignot *et al*., 2005).

۳- نتایج

بررسی لام‌های نشان داد کلیه ابتدایی یا پرونفروس در روز اول پس از تفریخ بلافاصله بعد از سرپوش آبششی وجود دارد که به صورت دو لوله پرونفریک به همراه بافت‌های خونساز در زیر نوتوکورد، بالای لوله گوارش و در امتداد بدن قرار گرفته است (شکل۱-۱). گلومرول در این روز مشاهده نشد و قسمت قدامی کلیه پرونفروس به طور جانبی با نوتوکورد و در فضای خونی (هموسل) بدون چین-خوردگی دیده می‌شود. توبول‌های پرونفروسی دارای سلول‌های مکعبی درشت با هسته مدور مرکزی و سیتوپلاسم مملو از ذرات ریز و درشت می‌باشند (شکل۱-۲). در روزهای دوم و سوم، توبولهای پرونفروسی به میزان کمی پیچ خورده بر قطر و طول آنها افزوده شده، درست در بالای کیسه زرده و در دو سمت نوتوکورد توبولهای پرونفروسی پروکسیمال را تشکیل می‌دهند که دارای بافت استوانه‌ای ساده بوده با هسته‌های قاعده‌ای تیره و سیتوپلاسم مملو از ذرات کروی کوچک می‌باشند (شکل۱-۳). در این مرحله هنوز گلومرول تشکیل نشده است. در روزهای ۴-۵ قسمتهای دارای عروق خونی بسیار بین توبولهای پرونفروسی دیده می‌شود که به نظر می‌رسد معادل گلوموس بوده و نقش فیلتراسیون خون را به عهده دارد (شکل۱-۴). توبول‌های جمع کننده پرونفروسی به صورت یک جفت به موازات دستگاه گوارش کشیده شده و در نزدیک مخرج، کیسه ادراری اولیه را می‌سازد (شکل۱-۵). گلومرول و نفرونها مشاهده نشد و منفذ ادراری در کنار کیسه ادراری اولیه با سلول‌های استوانه‌ای ساده و هسته‌های گرد قاعده‌ای دیده شد (شکل۱-۶). توبولهای مزونفروسی اولیه به صورت توده-های تیره رنگ با سلول‌های مکعبی و لومن بسیار کوچک در روز ششم ظاهر شدند (شکل۱-۷). فضای بین این توبولها را بافت خونساز کلیوی و سلول‌های خونی بسیار پر کرده بود. یک کیسه جمع کننده ادرار (مثانه) کوتاه در انتهای مجاری جمع کننده دیده شد (شکل۱-۸). سلول‌های مثانه، استوانه‌ای با هسته‌های کشیده در رأس و لومن ستاره‌ای که نسبت به روزهای قبل تمایز یافته‌تر بودند. در روزهای ۷-۱۲ به تدریج از

. Fluorescein Isothiocyanate

www.SID.ir

Archive of SID

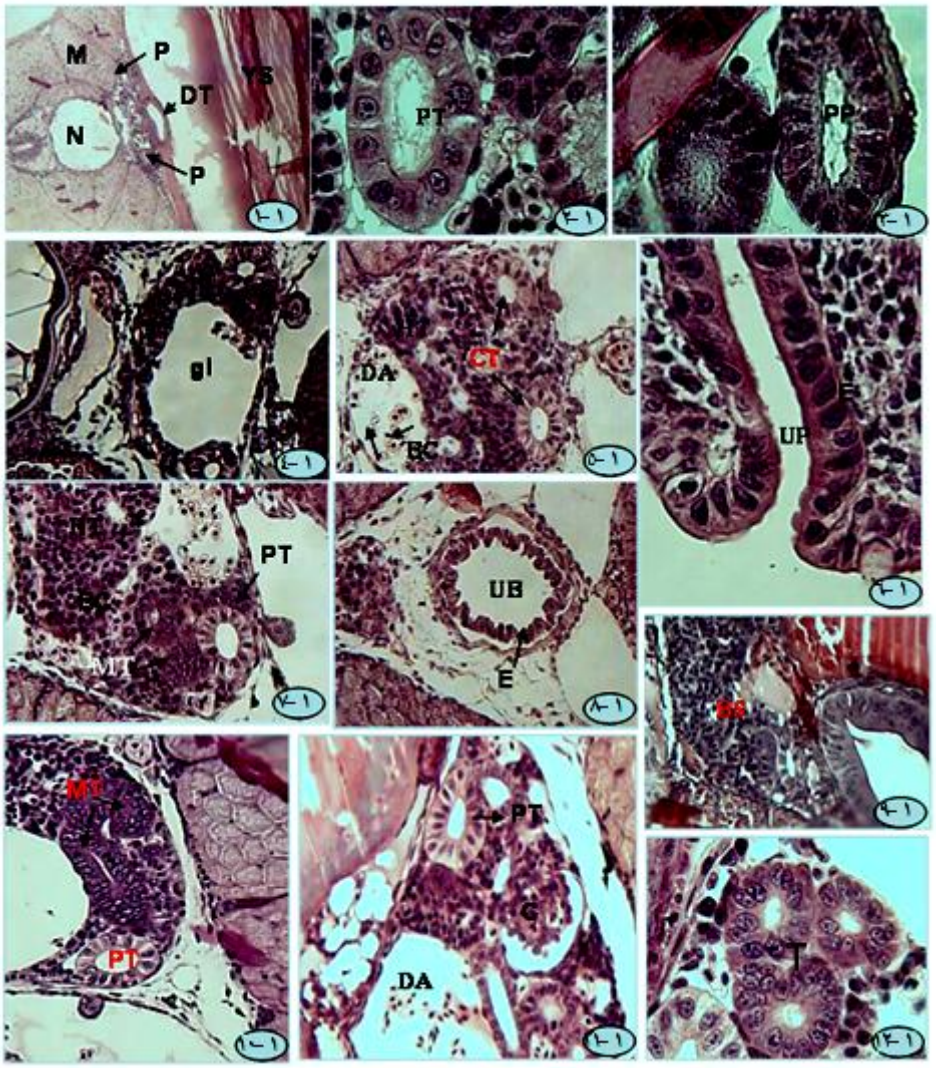
تعداد توبول‌های پرونفروسی در قسمت رأسی کلیه کاسته شده، فضاهای بدون توبول اطراف این مجاری با بافت خونساز جایگزین شد. تعداد زیادی سلول‌های خونساز در بین رأس و تنه کلیه دیده می‌شود. تعداد، اندازه و پیچیدگی توبولهای مزونفروسی در حال تشکیل، افزایش یافت اما همانند روزهای پیش این پیچیدگی و تعداد توبولها در ابتدای کلیه بود, سپس به صورت دو توبول کشیده متصل به مجاری و مختوم به کیسه ادراری مشاهده گردید (شکل۱-۹ و۱۰). در روز ۱۲ گلومرولها در تنه کلیه ظاهر شدند و احتمالاً زمان آغاز تشکیل نفرونهای مزونفروسی است که در فضای روشن کپسول بومن قرار گرفته‌اند (شکل۱-۱۱). در روز ۱۶ تشکیل توبول‌های مزونفریک که از روزهای قبل آغاز شده بود سرعت و نظم بیشتری به خود می‌گیرد و کلیه نهایی درحال تشکیل می‌باشد. بر تعداد اندازه و پیچیدگی توبولها از ابتدا تا انتهای کلیه افزوده شده (شکل۱-۱۲) و در کنار توبولها و مجاری جمع کننده, توبولهای مزونفریک کلیه نهایی دیده می‌شود که سیتوپلاسم تیره با لومن تنگ و کشیده دارد (شکل۲-۱) و در بین آنها گلومرول تمایز یافته‌تر از روزهای قبل و مملو از سلول‌های خونی و مزانشیال دیده می‌شود (شکل۲-۲). فضاهای خونی بین توبولها کوچک‌تر می‌شود و مجاری جمع کننده ادرار در سطح شکمی کلیه قرار می‌گیرد که از سلول‌های پهن دارای هسته‌های کروی مرکزی ساخته شده‌اند (شکل۲-۳). در فاصله بین روزهای ۱۶-۲۲ بر تعداد توبول‌های مزونفریک افزوده شده طوری که بافت خونی بین آنها کاهش یافته و تمام فضای کلیوی را این توبول‌ها اشغال می‌کنند. تشکیل گلومرول‌های جدید در طول مجاری جمع کننده ادرار در تنه کلیه قابل مشاهده است (شکل۲-۴).

در روزهای ۲۲ تا ۲۷ تشکیل کلیه مزونفروس کامل‌تر می‌شود که شامل توبول پروکسیمال, دیستال و مجاری جمع‌کننده است (شکل۲-۵). در روز ۲۷ در سر کلیه، مقداری بافت خونی و تعداد اندکی توبول پرونفروس مشاهده شد و توبولهای مزونفریک از نظر تعداد و تراکم در اکثریت بودند و گلومرول‌های پرخون در قسمت میانی بیشتر از سایر قسمت‌ها مشاهده گردید (شکل۲-۶).

مکان‌یابی آنزیم Na^+/K^+-ATPaseدر لارو یک روزه نشان داد که توبول های پرونفروسی دارای ایمونوفلورسانس قوی در قسمتهای قاعده‌ای خود بودند (شکل۳-۱). سلول‌های پوشاننده توبولهای جمع کننده پرونفروسی نیز ایمونوفلورسانس مشخصی از آنزیم در بخشهای جانبی سلول‌هایشان داشتند (شکل۳-۲). در فاصله روزهای سوم تا پنجم نتایج مکان‌یابی مشابه روزهای قبل بود. در روز ششم در سر کلیه توبول‌های پروکسیمال پرونفروس فلوئورسانس بسیار ضعیفی را نشان دادند (شکل۳-۳). توبولهای مزونفروسی درحال تشکیل، فاقد ایمونوفلورسانس بوده, دارای سلول‌های مکعبی ساده بودند (شکل۳-۴). در این روز در بخش خلفی، سلول‌های سازنده مجاری ادراری پرونفروسی در کل سیتوپلاسم از بخش قاعده‌ای تا رأسی خاصیت فلوئورسانس نشان دادند (شکل۳-۵). همچنین در این روزها گلومرول هنوز به وجود نیامده بود و در قسمت میانی کلیه، ایمونوفلورسانسی مشاهده نگردید.

www.SID.ir

Archive of SID

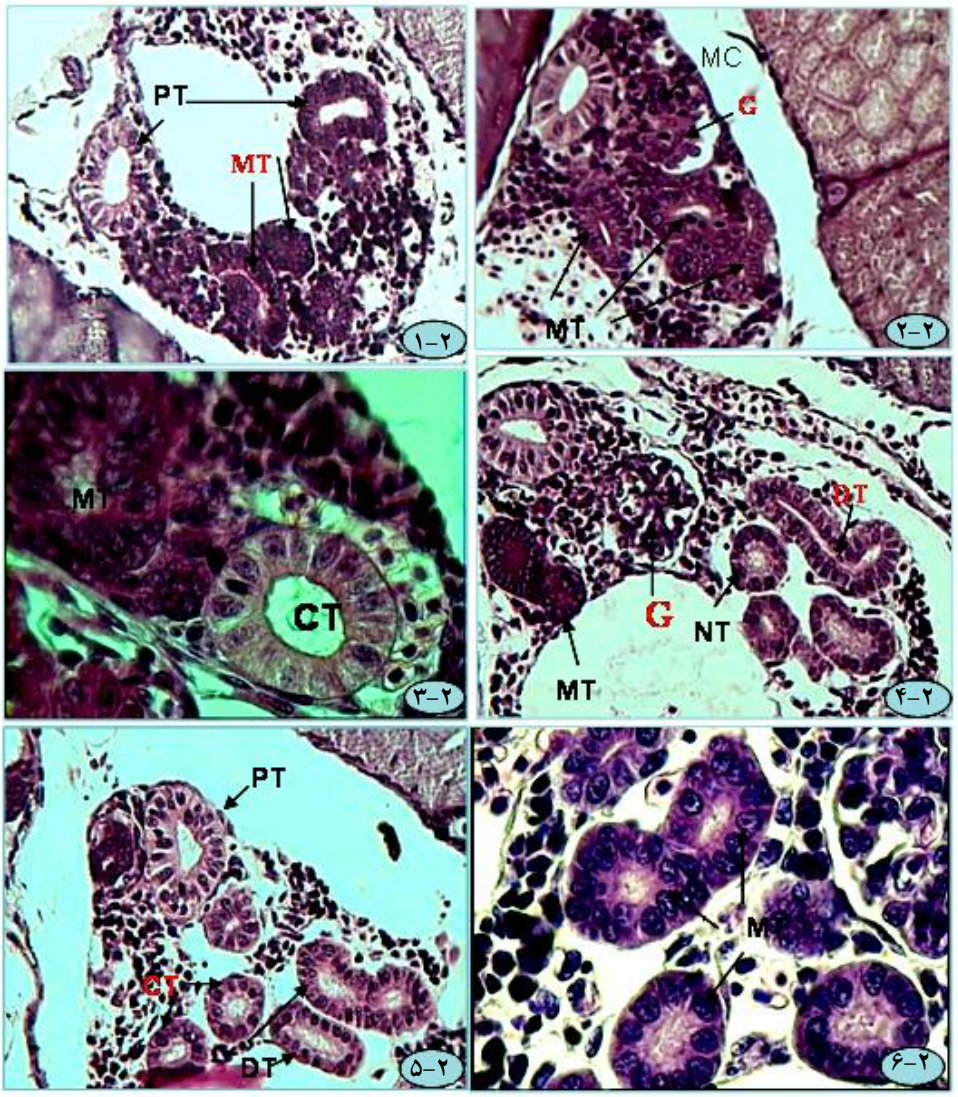


شکل۱- بافت‌شناسی مقاطع مختلف کلیه لارو ماهی آزاد از روز اول پس از تفریخ تا روز شانزدهم با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-فوشین
شکل۱ با بزرگنمایی X۱۰؛ شکلهای ۲-۳-۶-۱۲ با بزرگنمایی X۱۰۰؛ شکلهای ۴-۵- ۷-۸-۹-۱۰-۱۱ با بزرگنمایی X۴۰

BC: Blood Cell; BS: Bowman Space; CT: Collecting Tubul; DA: Dorsal Aorta; DT: Digestive tract; E: Epitelial; G: Glomerulus; gl: glumus; HT: Hemtopoitic Tissue; M: Mussle; MT: Mesonephrus Tubule; N: Notochord; P: Pronephrus; PP: Proximal Pronephrus; PT: Pronephrus Tubule; T: Tubules; UB: Urinary Bladder; YS: Yolk Sac.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- بافت‌شناسی مقاطع مختلف کلیه لارو ماهی آزاد خزر از روز هفدهم تا بیست و هفتم با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-فوشین. شکلهای ۱-۲-۴-۵-۶ با بزرگنمایی ۴۰X؛ شکل ۳ با بزرگنمایی ۱۰۰X

CT: Collecting Tubules; DT: Distal Tubules; G: Glomerulus; MT: Mesonephrus Tubule; NT: Neck Tubule; PT: Pronephrus Tubules.

در روزهای هشتم تا دهم، سلول‌های سازنده توبولهای دیستال تنه کلیه (شکل۳-۶) و سلول‌های مجاری جمع‌کننده ادرار، ایمونوفلوئورسانس قوی از آنزیم Na^+/K^+-ATPase در کل سیتوپلاسم نشان دادند (شکل۳-۷). طی روزهای ۱۱ تا ۲۰ رشد کلیه و تبدیل پرونفروس به مزونفروس با تشکیل گلومرول، توبولهای دیستال ایمونوفلورسانس نسبتاً قوی در کل سیتوپلاسم خود نشان دادند (شکل۳-۸). در توبولهای پروکسیمال پرونفروسی ایمونوفلورسانس نسبتاً ضعیفی مشاهده شد و توبول‌های پروکسیمال مزونفروسی درحال رشد فاقد ایمونوفلوئورسانس بودند (شکل۳-۹). در این مرحله نیز مجاری

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌کننده ادرار، خاصیت ایمونوفلورسانس در بخشهای قاعده‌ای سلول‌ها نشان دادند (شکل۳-۱۰). در روز بیستم سلول‌های سازنده توبول های پرونفروس مشابه روزهای قبل دارای ایمونوفلورسانس قوی بودند. در این روز ساختار تنه کلیه از نظر شکل‌گیری قطعات گردنی، توبولهای پیچیده پروکسیمال، دیستال و جمع‌کننده در نفرون‌های گلومرولـه و با ساخته شدن مجرای میزنای در سمت شکمی کلیه‌ها و مثانه در انتهای کلیه شکل گرفته است. روزهای ۲۱ تا ۲۷ با افزایش توبولهای مزونفروسی (قطعات گردنی، توبولهای پروکسیمال, دیستال و مجاری جمع کننده)، افزایش ایمونوفلورسانس در توبولهای مزونفریک دیستال قابل ملاحظه است. گلومرولها فاقد ایمونوفلورسانس بوده و توبول‌های پروکسیمال و قطعات گردنی ایمونوفلورسانسی نشان ندادند (شکل۳-۱۱و۱۲). در روز ۲۷ پس از تفریخ، توبولهای دیستال و جمع‌کننده در کل سیتوپلاسم (شکل۳-۱۳) و سلول‌های اپیتلیال میزنای و مثانه ایمونوفلورسنت خوبی از Na^+/K^+-ATPase را نشان دادند (شکل۳-۱۴و ۱۵).

۴- بحث و نتیجه‌گیری

در جنین و لارو ماهیان استخوانی، کلیه اولیه پرونفروس، سر کلیه یا Vorniere نامیده می‌شود (Varsamos *et al*., 2005, 2002 and 2001) که بعد با مزونفروس (اجسام ولفین یا Urniere) جایگزین می‌شود (Vize *et al*., 2003). در لاروهای آبزی وجود پرونفروس برای بقای جانور ضروری است و بدون داشتن کلیه‌های فعال، لارو به دلیل زندگی در محیط بسیار رقیق دچار ادم شده و می‌میرد (Vize *et al*., 2003; Eid and Brandli, 2001; Drummond *et al*., 2005; McDonald *et al*., 2002). ماهیان استخوانی، واحد ساختاری تنه کلیه، نفرون می‌باشد که مسئول تولید ادرار است (Stoskopf, 1993). برای حفظ تعادل آب و نمک ها بیشتر ماهیان استخوانی آب شیرین، نفرون تیپیک مهره داران را دارند که از بخشهای گلومرول، قطعه گردنی مژه‌دار، توبول‌های پروکسیمال یک و دو (Nishimura and Fan, 2003)، توبول میانی، توبول دیستال و توبول جمع‌کننده ساخته شده است و در نهایت به مجاری جمع‌کننده ادرار، میزنای و مثانه ختم می‌شود. گلومرول و توبول دیستال مسئول دفع آب در ماهیان هستند (Beyenbach, 2004). نفرون در بیشتر ماهیان فاقد بخش یا بخش هایی از نفرون تیپیک است. ماهیان استخوانی آب شیرین و دوزیستان، گویچه‌های ادراری بزرگی برای دفع آب اضافی از بدن دارند (Harder, 1975). به نظر می‌رسد این امر در مورد آزاد ماهیان نیز صادق باشد. به دلیل نقش کلیدی کلیه در فرایند سازگاری و حفظ هومنوستازی، مطالعات بسیاری در توصیف ساختار، فراساختار و عملکرد تنظیم اسمزی کلیه ماهیان استخوانی انجام شده است. این در حالی است که ساختار کلیه آزاد ماهیان خصوصاً در مراحل جنینی و پیش لاروی هنوز تا حد زیادی ناشناخته است و این خود دلیلی بر انجام این مطالعه است.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که آزاد ماهی خزر از روز اول تفریخ دارای کلیه پرونفروس بوده و تمایز و رشد و نمو آن برای عملکرد اصلیش, تنظیم اسمزی, در طول اونتوژنز اتفاق می‌افتد. گرچه مطالعات بسیاری مراحل اونتوژنیک رشد پرونفروس ماهی را توصیف کرده‌اند، زمان شروع کار پرونفروس در مورد بسیاری از گونه‌ها ناشناخته مانده است. مثلاً در لارو

www.SID.ir

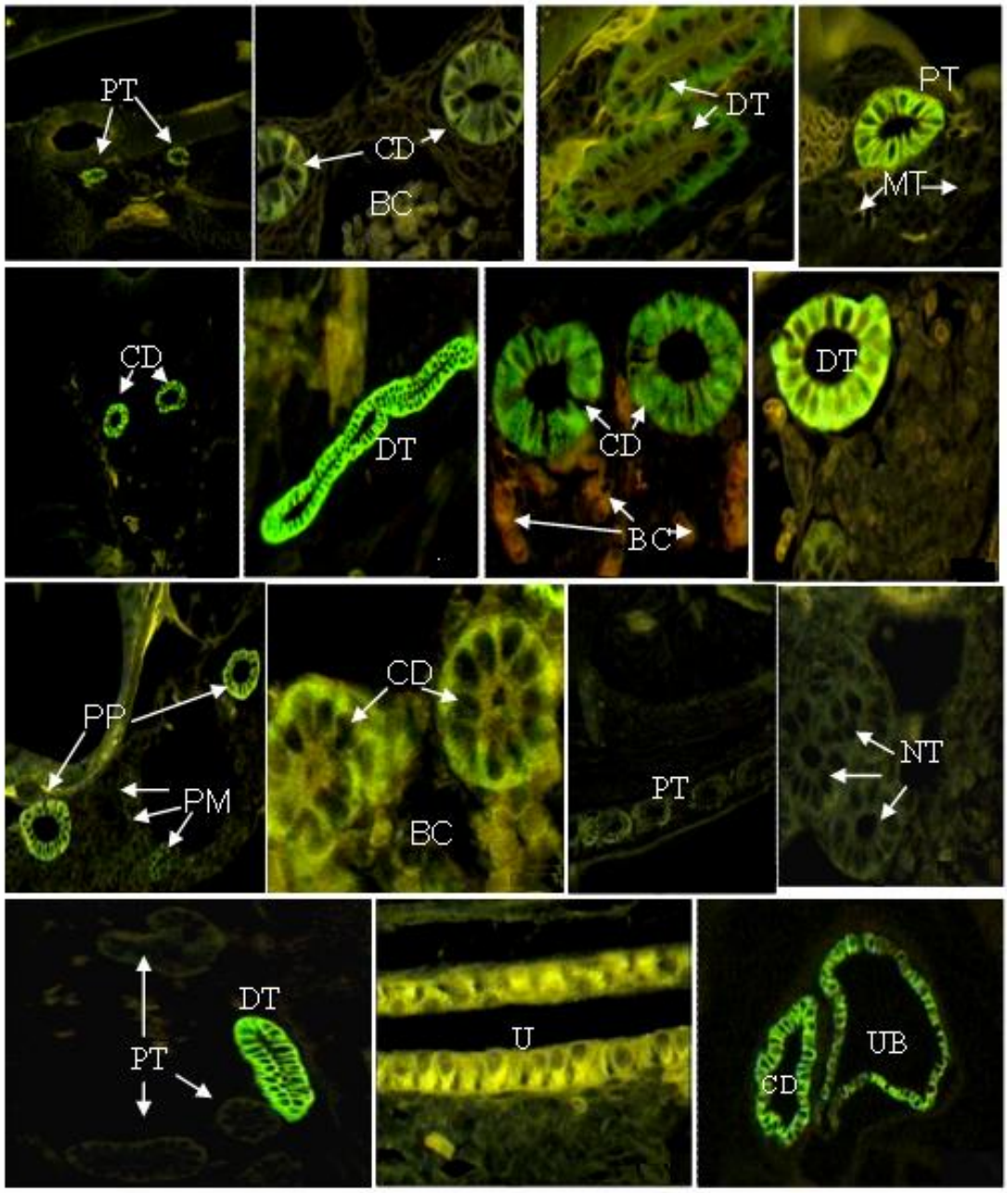
Archive of SID

بـاس دریـایی در زمـان بازشـدن دهـان (۵ روز پـس از تفریخ) پرونفروس ممکـن اسـت بـرای پـالایش، انتقـال یـون و تولیـد ادرار اسـتفاده شـود (Varsamos *et al.*, 2001). در مـورد آزاد ماهیـان،Nitler در ۱۹۸۷ بـه وجـود پرونفـروس عملکـردی در هفتـه نهـم پـس از تفـریخ در *Salmo trutta* اشـاره مـی‌کنـد و در مـورد گونـه مـورد بررسـی نیـاز بـه بررسـی‌هـای دقیقتـر مـی‌باشـد (Tytler, 1978). اما نتایج بافت‌شناسـی مؤیـد ایـن مطلـب اسـت کـه کلیـه پرونفروسـی از روز اول پـس از تفـریخ یـا شـاید قبـل از آن نیـز وجـود دارد و فعـال مـی‌باشـد و نقـش تنظـیم اسمزی خـود را بـرای سـازش لارو بـا محـیط بخـوبی انجـام می‌دهد. همچنین نتـایج تحقیـق حاضـر بیـانگر ایـن مطلـب اسـت کـه آزاد مـاهی در مراحـل لاروی کـه در آب شـیرین به سر می‌برد دارای گلـومرول بـزرگ بـا بافـت خـونی بسـیار است که از روز ۱۲ بعـد از تفـریخ ظـاهر شـده و رشـد و نمـو مـی‌کنـد. توبولهـای پروکسـیمال همچـون سـایر گونـه‌هـای ماهیان دارای بافت اسـتوانه‌ای سـاده بـا هسـته‌هـای قاعـده-ای تیـره و سیتوپلاسـم مملـو از ذرات کـروی کوچـک بـوده سـطح رأسـی ایـن سـلول‌هـا دارای میکروویلـی (پرزهـای کوچـک) اسـت (Ojeda *et al.*, 2003). نتـایج تحقیـق حاضر نشان داد کـه معمـولاً در اکثـر مقـاطع بـافتی, توبـول پروکسـیمال و دیسـتال همـراه بـا گلـومرول و مجـاری جمـع‌کننـده وجـود دارنـد. در ایـن لارو نفـرون تیپیـک ماهیان استخوانی به طـور کامـل تشـکیل نشـده و بـه زمـان بیشتری برای تمـایز بیشـتر احتیـاج مـی‌باشـد. در صـورتی کـه در تحقیـق تقـی‌زاده در سـال ۱۳۸۶ روی تـاس مـاهی ایرانـی، مشـخص گردیـد نفـرون کلیـه مرحلـه اول نوجـوانی *Acipenser persicus* سـاختار تیپیـک نفـرون ماهیـان اسـتخوانی آب شـیرین را دارد (تقـی زاده ۱۳۸۶). در طـول اونتـوژنی در ایـن لارو، رشـد و نمـو انـدامها و تغییـر در خصوصـیات مورفـو-آناتومیـک یکـی بعـد از دیگـری رخ مـی‌دهـد و باعـث تغییـر شـکل از لارو بـه جـوان مـی‌گـردد. همه قسـمتهای بـدن بـه طـور همزمـان بـا سـرعت یکسـان رشـد نکـرده و رشـد نسـبی تمـایز (آلـومتری) کـه ویژگـی عمـومی رشـد و نمـوی ماهیـان محسـوب مـی‌شـود (Gisbert *et al.*, 1999; Firat et al., 2005). در مـورد آزاد ماهیـان نیـز صـادق اسـت. تحقیقـات نشـان داده اسـت کـه بلافاصـله پـس از تفـریخ پـیش لاروهـای ماهیـان اسـتخوانی توانـایی تنظـیم اسـمزی داشـته و ظرفیـت تنظیم اسمزی آنهـا طـی فراینـد رشـد و نمـو افـزایش مـی-یابـد (Nebel et al., 2005). در مراحـل لاروی پـیش از تکوین آبشـش هـا، پوسـت بـدن و کیسـه زرده موقتـاً مکـان اصـلی تنظـیم اسـمزی بـوده، سـپس در طـول مراحـل اونتـوژنی از پوسـت بـه آبششـها و کلیـه‌هـا تغییـر مکـان می‌دهند.

همچنـین براسـاس تحقیقـات در حیوانـاتی مثـل ماهیـان و دوزیسـتان کلیـه نهـایی مزونفـروس بـوده و از تعداد بسـیار زیـادی نفـرون بـا گلومرولهـای داخلـی سـاخته شـده اسـت(Vize et al., 2003). وجـود گلـومرول در کلیـه‌هـای پرونفریـک چنـدین گونـه مـاهی اسـتخوانی تـازه تفـریخ شـده همچـون Chum Salmon, O. keta (Takahashi et al., 1978), Zebrafish, Danio rerio (Drummond et al., 1998), Guppy, Lebistes reticulates (Agrarwal and John, 1988), Oreochromis niloticus (Morrison et al., 2001) و Herring, C. harengus (Tytler et al., 1996). گـزارش شـده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- مکان‌یابی آنزیم Na^+/K^+-ATPase در بخشهای مختلف کلیه آزاد ماهی خزر در مراحل اولیه لاروی (D۱-D۲۷)
شکلهای۱-۵-۶-۹-۱۱ و ۱۵ با بزرگنمایی ۱۰x، شکلهای ۲-۳-۴-۷-۸-۱۲ و ۱۳ با بزرگنمایی ۲۰x و شکلهای ۱۰ و ۱۴ با بزرگنمایی ۶۰x.
BC: Blood Cell; CD: Collecting Duct; DT: Distal Tubule; MT: Mesonephrus Tubule; NT: Neck Tubule; PM: Proximal Mesonephrus; PP: Proximal Pronephrus; PT: Proximal Tubule; U: Ureter; UB: Urinary Bladder.

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه گلومرول در بین گونه‌های مختلف ماهیان تا حد زیادی متغیر است، اما آنچه مسلم است ماهیان استخوانی آب شیرین گلومرولهای بزرگتر و فراوانتری نسبت به ماهیان دریازی دارند (Stoskopf, 1993). در گونه مورد مطالعه کیسه ادراری کوچکی با لومن ستاره‌ای شکل نزدیک انتهای لوله گوارش (رکتوم) مشاهده گردید. وجود مثانه یا کیسه ادراری در بعضی از گونه‌های ماهیان نیز گزارش شده است, مثلاً در ماهی *Oreochromis niloticus* مجاری ادراری به مثانه‌ای کوچک باز می‌شوند که نزدیک انتهای دستگاه گوارش قرار گرفته است (Morrison *et al*., 2001) یا در تاسماهی ایرانی نیز کیسه ادراری کوچکی در انتهای سیستم ادراری از به هم پیوستن دو مجرای وسیع شکل می‌گیرد (تقی زاده ۱۳۸۶).مشاهدات حاضر از طریق بررسیهای ایمونوهیستوشیمی نیز نشان داد که کلیه پرونفروس از روز اول دارای فعالیت انتقال یونی بوده، برای بازجذب یون‌ها کاملاً فعال است. طی روزهای فعالیت پرونفروس، توبولهای پروکسیمال پرونفروس کاملاً در سلوم قرار گرفته بودند و نقش فیلترکنندگی را بـرعهده داشتنـد. از اینرو حداقل ایمونوفلوئورسانس و به عبارتی بازجذب یون سدیم در آنها مشاهده می‌شود. مشاهدات حاضر نشان داد که مواد زاید مایعات داخل سلوم به درون توبولهای پرونفروسی رانده شده، سپس مولکولهای ضروری بازجذب شده و به خون باز می‌گردند. فعالیت بالای آنزیم در قطعه دیستال نسبت به قطعات پروکسیمال در ماهیان آب شیرین به دخالت این توبول‌ها در بازجذب یون اشاره دارد (Petrova, 1981). در ماهی آزاد خزر وجود ایمونوفلوئورسانس قوی در نتیجه حضور قابل ملاحظه آنزیم Na^+/K^+-ATPase در توبول دیستال و مجرای جمع‌کننده ادرار پرونفروس نشان داد این دو بخش بشدت درگیر بازجذب یون سدیم و سایر یون‌ها هستند. ایمونوفلوئورسانس قوی در این دو بخش نشان از فعال بودن پرونفروس دارد و توانایی بالای این اندام را در حفظ یون و هموستازی نشان می‌دهد. در کنار قطعات دیستال و پروکسیمال، قطعه گردنی نیز در بین آنها مشاهده شد که فاقد ایمونوفلورسانس بود. این ناحیه گردنی، قطعه ابتدایی نفرون است که تقریباً بجز ماهیان استخوانی فاقد گلومرول در بقیه ماهیان مشاهده شده است. این قطعه در مهره‌داران عالی‌تر دیده نشده اما در دوزیستان باقیمانده است (Hickman, 1969). این توبول با بافت مکعبی کوتاه و مژه‌های بلند مشخص می‌شود. سلول‌های ایمونوفلوئورسانس به تعداد کمی در بافت سازنده دیواره مثانه در *Salmo truta* مشاهده شد *که* به عنوان آخرین محلهای بازجذب یون، تضمین می‌کنند که یون‌های وارد شده به ادرار تا حد ممکن به بدن بازگردانده شده است. نتایج تحقیق حاضر مشابه با مشاهدات محققان روی ماهیان دیگری همچون قزل-آلای رنگین‌کمان آب شیرین (*Oncorhynchus mykiss*) و Marine Gulf toadfish (*Opsanus beta*) است که در شرایط طبیعی (*In vivo*) بافت مثانه این دو ماهی، سدیم و کلر را به طور فعال بازجذب می‌کند (Zhou and Vize, 2004). مشاهدات این تحقیق براساس مکان‌یابی آنزیم Na^+/K^+-ATPase نشان داد که سلول‌های سازنده توبولهای پروکسیمال، ایمونوفلوئورسانس ضعیفی در قسمت قاعده ای- جانبی نشان می‌دهند که با نقش این سلول‌ها در بازجذب مواد از فیلتر مطابقت دارد. این سلول‌ها در امر انتقال NaCl فعال به نظر نمی-رسند. برخلاف توبول پروکسیمال، مکان‌یابی -Na^+/K^+ ATPase در سراسر سیتوپلاسم سلول‌های سازنده توبولهای دیستال ایمونوفلوئورسانسی قوی نشان داد که

www.SID.ir

Archive of SID

نشان‌دهنده فعالیت شدید این قسمت از نفرون در بازجذب یون سدیم است.

مهره‌داران آب شیرین با تولید ادرار رقیق، باید انرژی بیشتری برای استفاده از انتقال فعال جذب یون از آب محیط اطراف خود صرف کنند (Zhou and Vize, 2004). ترکیب این دو امر مهم و ضروری، یعنی نیاز به تولید حجم زیاد ادرار رقیق و به حداقل رساندن اتلاف یون، به این معناست که کلیه‌های جنینی باید در فرایندهای جذبی حداکثر کارایی و فعالیت را داشته باشند (Zhou and Vize, 2004). نتیجه‌گیری کلی از تحقیق حاضر بیانگر این مطلب است که لارو ماهی آزاد خزر از روزهای نخستین زندگی‌اش برای مقابله با نوسانهای یونی و براساس تکوین و تمایز اندامهای درگیر در مکانیسم‌های تنظیم اسمزی، قادر به فعالیت بازجذب یونی از طریق انتقال فعال در غشاهای سلولی کلیه بوده و این اندام در طول اونتوژنز و قبل از تکامل آبشش، عملکرد تنظیم اسمزی خود را بخوبی انجام می‌دهد و به نظر می‌رسد که برای دستیابی به اطلاعات بیشتر درخصوص تمایز بیشتر سیستم ادراری، باید به بررسی تغییرات اونتوژنیک در روزهای بعدی پراخته شود.

منابع

تقی‌زاده ز.؛ تغییرات پراکندگی و فراساختار سلول‌های یونوسیت در مراحل اولیه نمو تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*؛ استاد راهنما: صابر خدابنده, پایان نامه کارشناسی ارشد گروه بیولوژی دریا؛ دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی, دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۶؛ ص۶۵-۷۳.

صیاد بورانی م.؛ تعیین اندازه مناسب رهاسازی بچه ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* از طریق ارزیابی قابلیتهای تنظیم اسمزی، یونی و برخی از ویژگیهای دستگاه غدد درون ریز؛ استاد راهنما ابطحی ب.، رساله دکترای گروه شیلات, گرایش تکثیر و پرورش آبزیان گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۵؛ ۱۰۹ ص.

Agarwal S. and John P. A.; ((Studies on the Development of the Kidney of the Guppy, *Lebistes reticulatus*, part 1. The development of the Pronephros)); J. Anim. Morphol. *Physiol*; 1988; 35:17-24.

Beyenbach K.W. 2004. Kidneys Sans Glomeruli; Am. J. Physiol. Renal Physiol. 286**:** 811-827.

Curtis B. J. and Wood C. M. 1991. The Function of the Urinary Bladder in Vivo in the Freshwater rainbow Trout; J. Exp Biol. 155: 567-583.

Drummond I. A., Majumdar A., Hentschel H., Elger M., Solnica-Krezel L., Schier Al. F., Neuhauss S. C. F., Stemple D.L. and Zwartkruis F., Rangini Z., Driever W., Fishman M. C. 1998. Early development of the Zebra fish Pronephros and Analysis of Mutations Affecting Pronephric Function; Development;; 125: 4655-4667.

Drummond I. A. 2005. Kidney Development and Disease in the Zebra fish; J. Am. Soc. Nephrol. 16: 299-304.

Eid S. R. and Brandli A. W. 2001. Xenopus Na^+/K^+-ATPase: Primary Sequence of the Beta2 Subunit and in Situ Localization of Alpha1, Beta1, and Gamma Expression during Pronephric Kidney Dev. Diff. 68**:** 115–125.

Elger M., Hentschel H., Dawson M. and Renfro J.L. 2000. Urinary Tract. In:Ostrander GK (ed) The handbook of Experimental Animals; The Laboratory Fish. Academic Press, San Diego, 385-413.

Firat K., Saka S., Coban D. 2005. Early Life History of Cultured Common Dentex (*Dentex dentex* L. 1758); Turk. J. Vet. Anim. Sci. 29**:** 735-741.

Gisbert E.; Williot P. 1982. Castello Orvay F.; Behavioural Modifications of Siberian Sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) during Early Life Stages of Development:

www.SID.ir

Archive of SID

Nishimura H., Imai M.; Control of of Renal Function in Freshwater and Marine Teleosts. Feder Proc, 41:2355-2360.

Ojeda J. L., Icardo J. M., Domezain A. 2003. Renal Corpuscle of the Sturgeon Kidney: an Ultrastructural, Chemical Dissection, and Lectin-binding Study. Anat Rec A Discov. Mol. Cell Evol. Biol. 272(2): 73-563.

Petrova V. G. 1981. Electron Microscopic Study of epithelium of Distal NephronSection and Kidney Tubules of freshwater teleostean fishes; J. Ichthyol. 21:163-166.

Power D. M. 2005. Mini review: Developmental Ontogeny of Prolactin and its Receptor in Fish. Gen. Comp. Endocrinol. 142: 25-33.

Semenova O. G., Krayushkina L.S., Ogorzalek A. 2000. Ultrastructure of Chloride Cells in the Starred Sturgeon *Acipenser stellatus* and its Functional Changes during Adaptation to Seawater. Zool. Pol. 45/1-4:37-94.

Stoskopf M. K. 1993. Fish medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Co., p. 882.

Takahashi K., Hatta N., Sugawara Y., Sato R. 1978. Organogenesis and Functional Revelation of Alimentary Tract and Kidney of Chum Salmon. Tohoku J. Agricult Res. 29: 98-109.

Tytler P. 1978. Morphology of the Pronephros of the Juvenile browntrout, *Salmo trutta*; J. Morphol. 195: 189-204.

Tytler P., Ireland J., Fitches E. 1996. A study of the Structure and Function of the Pronephros in the Larvae of the Turbot (*Scophthalmus maximus*) and the Herring (*Clupea harengus*). Mar. Fresh. Behav. Physiol. 28: 3-18.

Varsamos S., Connes R., Diaz J. P., Barnabe G., Charmantier G. 2001. Ontogeny of Osmoregulation in the European Sea bass *Dicentrarchus Labrax*, L. Mar. Biol. 138: 909-915.

Varsamos S., Diaz J. P., Chamantier G., Blasco C., Connes R., Flik G. 1999. Location and Morphology of Chloride Cells During the Post-embryonic Development of the European Their Significance and Use. J. Appl. Ichth. 15: 237-242.

Harder W. 1975. Anatomy of fishes. 2 vols. E. Schweizerbart, Stuttgart, Germany.

Hentschel H., Elger M. 1987. The Distal Nephron in the Kidney of Fishes; Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 108: 1-151.

Hickman Jr C. P., Trump B. F. 1969. The Kidney. In: Hoar W.H., Randall D.J. (Eds.), Fish Physiology. Vol. 1. Academic Press, New York, 91-239.

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 Res. 319: 153-165.

Khodabandeh S. 2006. Na^+/K^+-ATPase in the Gut of the Zygoptera, *Ischnura elegans*, and Anisoptera, *Libellula lydia*, Larvae (Odonata): Activity and Immmunocytochemical Localization. Zool. Sci. 45: 510-516.

Khodabandeh S. 2007. Ultrastructure and Osmoregulatory Function of Branchial Chamber in the Larvae of Dragonfly: *Libellula lydia* (Odonata); J. Agr. Sci. Biotech. 9: 231-241.

Lignot J. H., Nugroho Susanto G., Charmantier-Daures M., Charmantier G. 2005. Immunolocalization of Na^+/K^+-ATPase in the Branchial Cavity during the Early Development of the Crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). Cell Tissue Res. 319: 331-339.

Martoja R., Martoja-Pierson M. 1967. Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale; Masson et cie Editeurs, Paris.

McDonald M. D., Walsh P. J., Wood C. M. 2002. Transport Physiology of the Urinary Bladder in Teleosts: A Suitable Model for Renal Urea Handling?; J. Exp. Zool. 292**:** 604-617.

Morrison C. M., Miyake T., Wright J. R. 2001. Histological Study of the Development of the Embryo and Early Larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). J. Morphol. 247:172-195.

Nebel C., Nègre-Sadargues G., Blasco C., Charmantier G. 2005. Morphofunctional ontogeny of the Urinary System of the European Seabass, *Dicentrarchus labrax*. Anat. Embryol. 209: 193-206.

www.SID.ir

Archive of SID

Varsamos S. and Nebel C., Charmatier G. 2005. Review: Ontogeny of Osmoregulation in Postembryonic Fish. Comp. Biochem. Physiol. 141: 401-429.

Vize P. D., Woolf A. S., Bard J.; The Kidney, from Normal Development to Congenital Disease; Academic Press. Amsterdam; 2003.

Zhou X., Vize P. D. 2004. Proximo-distal Specialization of Epithelial Transport Processes within the Xenopus Pronephric Kidney Ttubules. Dev. Biol. 271: 3-322.

www.SID.ir