

## ساختار آبشش و فراوانی یونوسیت‌های آن در لارو بیست و پنج روزه تاس‌ماهی

### ایرانی (*Acipenser persicus* (Borodin 1897)

زهرا تقی‌زاده رحمت‌آبادی<sup>۱</sup>، صابر خداپنده\*<sup>۲</sup> و بهروز ابطحی<sup>۳</sup>

۱ - دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲ - دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۳ - دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۲

دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۳۱

\* نویسنده مسئول مقاله: [skhoda@modares.ac.ir](mailto:skhoda@modares.ac.ir)

#### چکیده

ساختار آبشش و پراکنش یونوسیت در بافت آبششی لارو بیست و پنج روزه تاس‌ماهی ایرانی (۴۱۷/۳ میلی گرم میانگین وزن) به روش بافت‌شناسی کلاسیک و رنگ‌آمیزی H&E بررسی شد. برای مشاهده یونوسیت با آشکارسازی آنزیم  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase از آنتی‌بادی  $\text{IgG}\alpha_5$  و آنتی‌بادی FITC، در میکروسکوپ نوری فلورسانس با فیلترهای nm ۴۹۰-۴۵۰ استفاده گردید. نتایج نشان داد در هر محفظه آبششی، چهار کمان آبششی کامل و نیمه آبشش سرپوش آبششی قرار دارند. در ساختار تیغه آبششی، سلول‌های سنگفرشی ساده، سلول‌های پیلار در دو سمت فضا‌های خونی (لاکونا) و سلول‌های خونی دیده شدند. تراکم بالایی از یونوسیت‌ها (به‌طور متوسط ۵۲۹/۷۳ یونوسیت در یک میلی‌متر مربع بافت آبشش)، بر روی پایه تیغه‌های آبششی، ناحیه بین تیغه‌های آبششی، بر روی رشته‌های آبششی و جدار آبششی مشاهده گردید. یونوسیت‌ها با داشتن اندازه درشت، هسته کروی و سیتوپلاسم روشن‌تر، از سایر سلول‌ها قابل تشخیص بودند. سلول‌ها، به‌دلیل داشتن تراکم بالایی از این آنزیم، دارای ایمونوفلورسانس قوی در سیتوپلاسم و به‌خصوص در سمت غشای قاعده‌ای-جانبی بودند. نتایج نشان داد که در این مرحله از زندگی تاس‌ماهی، ساختار آبشش شکل گرفته و به‌عنوان یک اندام تنظیم‌اسمزی، در کنار نقش تنفسی و دفعی خود، برای جذب و حفظ یون‌ها در یک محیط هیپوتونیک فعالیت می‌کند.

کلید واژگان: آبشش، آنتی‌بادی  $\text{IgG}\alpha_5$ ، آنزیم  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase، یونوسیت، *Acipenser persicus*

## مقدمه

ماهیان متنوع‌ترین و قدیمی‌ترین گروه مهره‌داران هستند (Beyenbach, 2004). سازوکارهای تنظیم اسمزی-یونی در آن‌ها به طرز چشم‌گیری رشد کرده و به آن‌ها امکان سکونت و بقا در آشیان‌های اکولوژیک بالقوه بسیاری، از آب‌های سرد و یخ زده دریاها و قطبی گرفته تا دریاچه‌های قلیایی استوا را داده است (Flik and Verbost, 1993). ماهیان خاویاری (Acipenseridae) متعلق به راسته Acipenseriforms، نماینده گروهی قدیمی از ماهیان غضروفی-استخوانی هستند که با ۳۰ گونه و زیرگونه در اکوسیستم‌های آب شیرین، لب شور و به صورت مهاجر به اقیانوس‌ها پراکنش دارند (Bemis and Kynard, 1997). آبشش‌ها در ماهیان خاویاری نیز همانند سایر ماهیان، مهم‌ترین محل تماس آب و ماهی محسوب می‌شوند و با وجود اشغال محفظه‌ای به نسبت کوچک، مساحت زیادی را در برمی‌گیرند که بیانگر نقش کلیدی این اندام در انجام اعمال متنوعی همچون انتشار گازهای تنفسی، دفع مواد زائد و تنظیم اسمزی است (Isiag and Karakisi, 1998). ساختار کلی این اندام چند منظوره در بیشتر ماهیان استخوانی مشابه است. هر چند اغلب محققان معتقدند عملکرد فیزیولوژیک سلول‌های آبشش ماهیان آب شیرین نسبت به آب شور (Evans et al., 2005) به خصوص در مراحل اولیه رشد و نمو، پیچیده‌تر است.

بررسی‌های انتوژنیک اندام‌های تنظیم یونی در ماهیان نشان داده که به دلیل متفاوت بودن طول دوره تکوین جنینی، تخم‌گذاری و لاروی، زمان تشکیل اندام‌های تنظیم یونی متفاوت بوده و در هر مرحله‌ای از مراحل رشد و نمو، اندام یا اندام‌های خاصی نقش کلیدی را بر عهده دارند. برای مثال، در روزهای نخست پس از تفریح، با توجه به بسته بودن دهان و عدم تشکیل آبشش و کلیه در

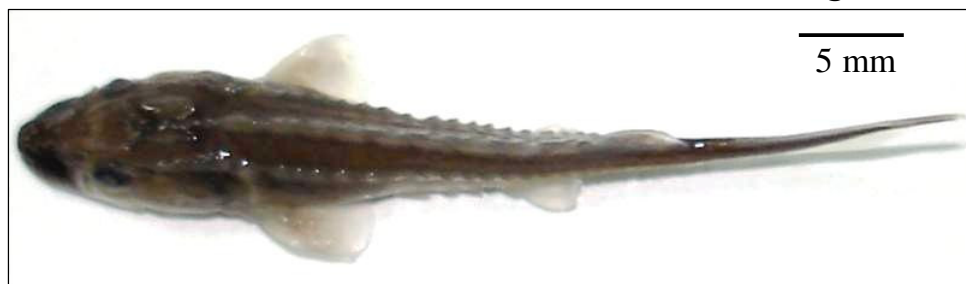
بیش‌تر ماهیان، پوست اندام مهم تنظیم یونی است (Varsamos et al., 2005; Chang et al., 2003; Wales and Tytler, 1996) از این رو شناخت زمان شکل‌گیری آبشش و حضور سلول‌های تنظیم یونی در مراحل اولیه رشد ماهیان پر اهمیت است.

در سطح سلولی، فرایند تنظیم اسمزی به وجود یونوسیت‌ها (سلول‌های غنی از میتوکندری یا سلول‌های کلراید) متکی است که آنزیم انتقال یون  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA) در روی درون‌رفتگی و چین‌خوردگی غشای قاعده‌ای-جانبی شان قرار گرفته است (Khodabandeh et al., 2005a, b; Evans et al., 2005). یونوسیت‌ها با توجه به مقدار شوری (ترکیب و مقدار یون‌های) محیط که عملکرد متفاوت این سلول‌ها در دفع یا جذب یون را سبب می‌گردد، تغییر می‌کند (Shiraishi et al., 1997; Uchida et al., 1996). مورفولوژی و ساختار آن‌ها در ماهیان آب شیرین قبلاً به طور وسیعی مطالعه شده است (Taghizadeh R.A. et al., in press; Evans et al., 2005; Varsamos et al., 2005; Seidelin et al., 1999). یونوسیت‌ها عموماً به لحاظ ساختاری، کروی یا تخم‌مرغی، بزرگ، دارای میکروویلی‌های رأسی یا حفره رأسی بوده و چین‌های گسترده غشای قاعده‌ای-جانبی آن‌ها سیستمی توبولی مرتبط با میتوکندری‌ها شکل داده است (Evans et al., 2005; Varsamos et al., 2005; Hazon et al., 2003; Hirose et al., 2003). این سلول‌ها با داشتن این ویژگی‌های فراساختاری و آنزیمی متفاوت از سایر سلول‌های بافت آبشش، محل اصلی جذب یون‌های ضروری موجود در آب شیرین محسوب می‌شوند و خصوصیات آن‌ها در ماهیان استخوانی بالغ، موضوع مطالعات کلیدی و کاربردی متعددی شده است (Evans et al., 2005; Seidelin et al., 1999).

پنج روزه تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* Borodin 1897، از مکانیابی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase با استفاده از آنتی‌بادی IgG $\alpha_5$ ، برای تعیین پراکنش یونوسیت‌ها استفاده شده است.

#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ده عدد لارو بیست و پنج روزه تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* با متوسط طول کل ۴۵ میلی‌متر و متوسط وزن ۴۱۷/۳ میلی‌گرم (شکل ۱) از ونیروهای مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی در استان گلستان، در خرداد ماه سال ۱۳۸۳ جمع‌آوری و در محلول بوئن تثبیت شدند. لاروها پیش از تثبیت‌شدن، با افزودن مقدار بیش از حد MS-222 به آب بیهوش شدند. دمای آب بین  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  و شوری تقریباً ppt ۰/۵۶ تعیین گردید.



شکل ۱ لارو تاس‌ماهی ایرانی بیست و پنج روزه.

**ایمونوهیستوشیمی:** از قالب‌های پاراپلاست به‌وسیله میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه و روی لام‌هایی با پوشش Poly-L-Lysin قرار داده شدند. تعیین مکان حضور آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase با استفاده از

آنتی‌بادی IgG $\alpha_5$  (Mouse Monoclonal Antibody Raised Against the  $\alpha$ -subunit of the Chicken  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase made by Developmental Studies) تهیه شده از (Hybridoma Bank, University of Iowa; <http://dshb.biology.uiowa.edu/> USA) و آنتی‌بادی FITC (Monoclonal Mouse Anti-fluorescein

فراوانی یونوسیت‌ها و پمپ سدیم-پتاسیم ظرفیت تنظیم اسمزی را تحت تأثیر قرار داده و توانایی ماهی را در بردباری به شوری و نوسانات آن کنترل می‌کند (Nebel et al., 2005). اگرچه هنوز از روش بافت‌شناسی کلاسیک برای مطالعه یونوسیت‌ها استفاده می‌شود، ولی روش مناسبی نبوده و اغلب دیگر سلول‌ها از جمله سلول‌های موکوسی و کمکی آبشش، به اشتباه یونوسیت تشخیص داده می‌شوند. در حال حاضر از مکان‌یابی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase، به‌عنوان روشی مطمئن برای شناسایی یونوسیت‌ها در آبزیان مختلف مهره‌دار و بی‌مهره استفاده می‌شود (Taghizadeh et al., 2011; Ouattara et al., 2009; Khodabandeh and Taghizadeh, 2006; Khodabandeh et al., 2005a, b; Nebel et al., 2005; Chen et al., 2004). با توجه به متفاوت بودن و اهمیت اندام‌های تنظیم یونی در مراحل اولیه زندگی آبزیان، در تحقیق حاضر، ضمن شرح ساختار آبشش در لارو بیست و

**بافت‌شناسی:** طبق روش ارائه‌شده از سوی Martoja and Martoja-Pierson (1967) و Khodabandeh و همکاران (2005a,b)، انجام شد. به این نحو که پس از طی مراحل آبگیری، قالب‌گیری در پاراپلاست (Cole-Parmer; [www.coleparmer.com](http://www.coleparmer.com)) و تهیه برش‌هایی به ضخامت ۵-۳ میکرون، برای بافت‌شناسی از رنگ‌آمیزی H&E استفاده گردید. اسلایدها با میکروسکوپ نوری فلورسانس (Nikon, Eclipse E 200) مجهز به دوربین مشاهده و عکس‌برداری شدند.

رشته‌های آبششی جدید و در حال تشکیل در قسمت بالای کمان آبششی دیده شدند (شکل ۲ الف). در رشته‌های آبششی، رگ‌های خونی آوران و وبران، اسکلت غضروفی نگه‌دارنده تیغه و مقدار کمی عضله در قسمت پایه رشته مشاهده شد (شکل ۲ ب). تیغه‌های آبششی کوچک در حال رشد و نمو (شکل ۲ ب)، به دلیل حضور اپی تلیای زاینده در رأس رشته آبششی، در این بخش مشاهده شدند. تیغه‌های آبششی با سلول‌های پوششی سنگ‌فرشی ساده پوشیده شده بودند (شکل ۲ ج). در ساختار تیغه، سلول‌های پیلار در دو سمت فضاهای خونی (لاکونا) که محتوای سلول‌های خونی بودند، دیده شدند (شکل ۲ ج). سلول‌های تنظیم‌کننده یونی (سلول‌های کلراید یا سلول‌های غنی از میتوکندری) در بین سلول‌های سنگ‌فرشی در روی رشته‌های آبششی و کمان آبششی پراکنده بودند (شکل ۲ ب و ج). سلول‌های یونوسیت به لحاظ رنگ روشن‌تر سیتوپلاسم، اندازه درشت و هسته‌های کروی قاعده‌ای از سایر سلول‌ها متمایز بودند (شکل ۲ ج). مکانیابی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  حضور یونوسیت‌ها را در بخش‌های مختلف بافت آبشش نشان داد (شکل ۳ الف و ب). با استفاده از آنتی‌بادی  $\text{IgG}_{\alpha 5}$ ، تراکم بالایی از یونوسیت‌ها، بر روی پایه تیغه‌های آبششی، ناحیه بین تیغه‌های آبششی، بر روی رشته‌های آبششی و جدار آبششی مشاهده گردید (شکل ۳ الف و ب). این سلول‌ها با تراکم کم‌تر روی تیغه‌های آبششی، کمان آبششی و دیواره محفظه آبششی نیز مشاهده شدند. در بخش رأسی رشته‌های آبششی، یونوسیت‌ها تقریباً مشاهده نشدند (شکل ۳ الف و ب). ایمونوفلورسانس قوی در کل سیتوپلاسم یونوسیت‌ها مشاهده گردید که در سمت غشای قاعده‌ای-جانینی تراکم بیش‌تری داشت (شکل ۳ ب و ج).

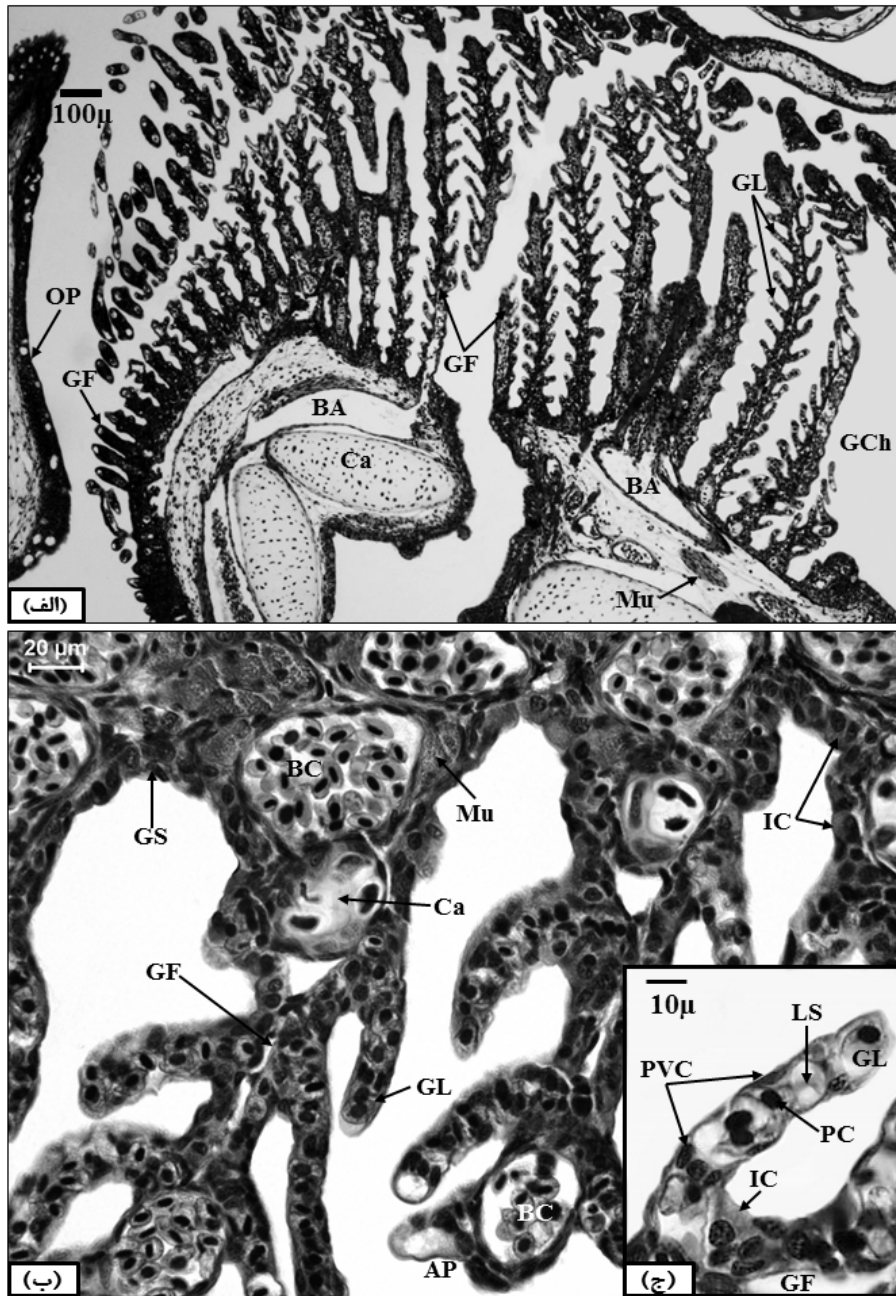
Antibody; Jackson Immuno Research, USA) گرفت (Taghizadeh R. A. et al. 2011; Giffard-Mena et al., 2006; Khodabandeh and Taghizadeh, 2006; Khodabandeh et al., 2005a,b).

لام‌ها با میکروسکوپ نوری فلئورسانس (Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak 1- Lambda Lamp, [www.olympusmicro.com](http://www.olympusmicro.com)) با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ nm مشاهده و از بافت‌های مورد نظر عکس‌برداری شد.

به کمک نرم‌افزار (National Institutes of health, USA- <http://imagej.nih.gov/ij>) ImageJ 1.47v، متوسط طول و عرض رشته و تیغه‌های آبششی، با استفاده از ۳۰ تصویر از مقطع عرضی آبشش اندازه‌گیری شد. برای شمارش یونوسیت‌ها در واحد سطح، مجموع سطوح ۲۸ تصویر ایمونوهیستوشیمی با مساحت کل ۴/۵۶ میلی‌متر مربع از مقطع عرضی کل بافت جدار آبششی، رشته و تیغه‌های آبششی اندازه‌گیری شد و یونوسیت‌ها شمارش شدند.

## نتایج

مشاهدات بافت‌شناسی نشان داد در تاس‌ماهی بیست و پنج روزه، در هر دو محفظه آبششی، چهار کمان آبششی کامل (شکل ۲ الف) و نیمه آبشش سرپوش آبششی (opercular hemibranch) شکل گرفته است. سرپوش آبششی بخش زیادی از آبشش را پوشانده و فقط انتهایی‌ترین بخش رشته‌ها و تیغه‌های آبششی از سرپوش آبششی بیرون زده‌اند. رشته‌های آبششی و تیغه‌های آبششی در ساختار آبشش مشاهده شدند (شکل ۲ الف و ب). رشته‌های آبششی، به جدار آبششی (سپتوم) در بخش انتهایی و نزدیک به کمان آبششی متصل هستند، اما در بخش‌های پایین آزادند. پالاینده‌های آبششی (Gill raker) مشاهده نشدند. در ساختار کمان آبششی، غضروف، عضله و رگ‌های خونی مشاهده شدند (شکل ۲ الف و ب).

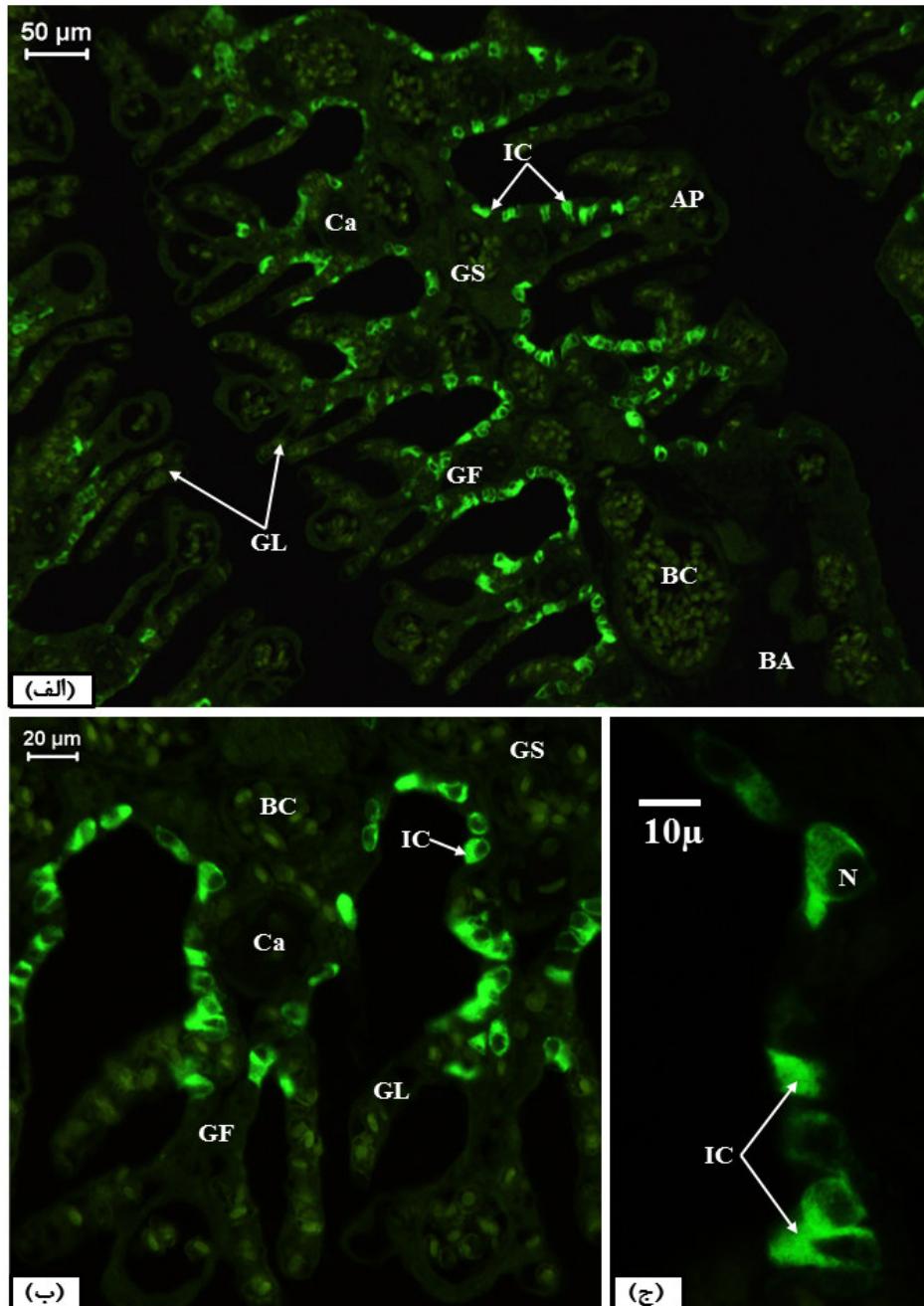


شکل ۲ بافت‌شناسی آبشش تاس‌ماهی ایرانی ۲۵ روزه (H&E). (الف) برش طولی کمان آبششی حامل رشته‌ها و تیغه‌های آبششی؛ (ب) ساختار رشته آبششی و (ج) ساختار و سلول‌های تیغه آبششی. بخش رأسی رشته آبششی و اپیتلیای زاینده تیغه آبششی (AP)؛ کمان آبششی (BA)؛ سلول خونی (BC)؛ غضروف (Ca)؛ محفظه آبششی (GCh)؛ رشته آبششی (GF)؛ تیغه آبششی (GL)؛ جدار آبششی (GS)؛ یونوسیت (IC)؛ فضای خونی یا لاکونا (LS)؛ عضله (Mu)؛ سرپوش آبششی (OP)؛ سلول پیلار (PC)؛ سلول پوششی سنگ‌فروشی (PVC).

## بحث

آبشش‌ها نقش بسیار مهمی در ثابت نگه‌داشتن ترکیب یونی درون بدن در مواجهه با محیط آب شیرین دارند. در این شرایط، ماهی با مشکل ورود آب به بدن و خروج یون‌ها روبه‌روست. از این‌رو، به بافت‌ها و سلول‌های خاصی برای جذب فعالانه یون‌های ضروری (به‌خصوص سدیم)، بازگرداندن یون‌های از دست رفته و خروج آب اضافی نیاز دارد (Evans et al., 2005; Khodabandeh et al., 2005a, b). یکی از سازوکارهای بسیار مهم انتقال فعال، پمپ سدیم - پتاسیم است. این پمپ، یون‌های سدیم را از درون سلول به بیرون از آن (درون خون) و برعکس یون‌های پتاسیم را از خون به درون سلول می‌راند. این پمپ معمولاً در تمام سلول‌ها وجود دارد ولی تراکم آن در سلول‌های دخیل در تنظیم یونی (مانند یونوسیت‌ها) خیلی بیش‌تر است. پروتئین حامل این پمپ از دو زیر واحد کاتالیتیک پروتئین  $\alpha$  همراه با دو زیر واحد  $\beta$  ساخته شده است.

یونوسیت‌ها تقریباً به‌صورت مجتمع دیده شدند و نسبت به سلول‌های خونی رنگ‌پذیری کاملاً متفاوتی داشتند (شکل ۳ الف و ب). در درشت‌نمایی بزرگ‌تر مشاهده شد که این سلول‌ها گرد- بیضوی بوده و یک هسته درشت در بخش قاعده‌ای دارند (شکل ۳ ج). در تمام مشاهدات هسته سلول‌ها تاریک ماندند (شکل ۳ ج). به کمک نرم‌افزار ImageJ برای شمارش یونوسیت‌ها،  $4/56$  میلی‌متر مربع مقطع عرضی از کل بافت جدار آبششی، رشته و تیغه‌های آبششی اندازه‌گیری شد. در هر یک میلی‌متر مربع ( $1 \text{ mm}^2$ )، به‌طور متوسط تعداد  $529/73$  یونوسیت مشاهده گردید. متوسط طول رشته آبششی  $189/77$  میکرومتر (حداکثر  $264/35$  و حداقل  $95/66$  میکرومتر) و متوسط عرض رشته آبششی  $51/34$  میکرومتر (حداکثر  $120/2$  و حداقل  $19/8$  میکرومتر) تعیین شد. طول متوسط تیغه‌های آبششی  $68/89$  میکرومتر (حداکثر  $141/8$  و حداقل  $25/9$  میکرومتر) و عرض آن  $16/19$  میکرومتر (حداکثر  $29/5$  و حداقل  $10/35$  میکرومتر) تعیین گردید.



شکل ۳ مکانیابی ایمنیایی آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  آبشش تاس‌ماهی ایرانی ۲۵ روزه. (الف) برش عرضی کمان آبششی، نشان‌دهنده پراکنش یونوسیت‌ها روی کمان آبششی، جدار آبششی، رشته‌ها و تیغه‌های آبششی؛ (ب) پراکنش یونوسیت‌ها در روی رشته‌های آبششی بیانگر نبود یونوسیت‌ها در بخش‌های راسی رشته آبششی است و (ج) یونوسیت‌ها. بخش راسی رشته آبششی (AP)؛ کمان آبششی (BA)؛ سلول خونی (BC)؛ غضروف (Ca)؛ رشته آبششی (GF)؛ تیغه آبششی (GL)؛ جدار آبششی (GS)؛ یونوسیت (IC)؛ هسته (N).

رشد و نموی آبشش در ماهیان استخوانی محسوب می‌شود که طبق آن، قدیمی‌ترین تیغه‌های آبششی در بخش پایه رشته‌ها و جدیدترین و کوچک‌ترین تیغه‌ها در سمت رأسی رشته مشاهده می‌شوند. این در حالی است که درباره کوسه‌ها ناحیه رشد و نموی تیغه‌های جدید، در بخش پایه رشته آبششی قرار دارد و قدیمی‌ترین تیغه‌های آبششی در بخش رأسی رشته مشاهده می‌شوند (Stoskopf, 1993). یونوسیت‌ها که سلول‌هایی تخصص یافته هستند، روی قسمت رأسی رشته‌های آبششی تاس‌ماهی ایرانی، جایی که تشکیل تیغه‌های جدید و در نهایت تمایز سلولی در آن رخ می‌دهد و بافت زاینده قرار دارد، مشاهده نشدند. نتایج به دست آمده با مشاهدات انجام شده روی پراکنش یونوسیت‌ها در گونه‌های متعدد ماهیان استخوانی آب شیرین (Khodabandeh and Taghizadeh, 2006; Evans et al., 2005) و نیز سایر مراحل رشد و نموی تاس‌ماهی ایرانی مطابقت داشت (Taghizadeh R.A. et al., in press).

در مطالعه حاضر، در هر یک میلی‌متر مربع از بافت آبشش تاس‌ماهی ایرانی  $17/3 \text{ mg}$ ، به‌طور متوسط تعداد  $529/73$  یونوسیت مشاهده گردید. این مقدار در مقایسه با مشاهدات انجام شده در مطالعات مربوط به آبشش بچه ماهی ۲-۳ گرمی تاس‌ماهی ایرانی، که در هر ۲ میلی‌متر مربع از سطح بافت آبششی،  $289$  یونوسیت شمارش شده است (Khoshnood et al., 2010)، بیانگر تراکم بیشتری از یونوسیت‌ها روی سطوح آبششی تاس‌ماهی ۲۵ روزه است. مقایسه تعداد یونوسیت‌ها در بافت آبششی تاس‌ماهی ایرانی ۲-۳ گرمی با بعضی گروه‌های ماهیان قبلاً بررسی شده است (Khoshnood et al., 2010). با توجه به تفاوت تعداد یونوسیت‌ها در بافت آبششی در وزن و سنین

وزن زیر واحد بزرگ‌تر یعنی زیر واحد  $\alpha$ ، تقریباً دو برابر وزن زیر واحد کوچک‌تر یا زیر واحد  $\beta$  است. زیر واحد  $\beta$  کمپلکس پروتئین را در غشای چربی نگه می‌دارد، در حالی که زیر واحد  $\alpha$  گیرنده‌های سدیم و پتاسیم داشته و قسمتی از درون آن فعالیت ATPase ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) دارد (Hirose et al., 2003). پروتئین  $\alpha$  دارای واکنش‌پذیری ایمنیایی (Immunoreactivity) است و ثابت شده که شدت این واکنش به میزان آنزیم مرتبط است (Shikano and Fujio, 1998). آنتی‌بادی  $\text{IgG}\alpha^5$  در واکنش با آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase، ایمونوفلوئورسانس قابل ملاحظه‌ای تولید کرده و محل حضور آنزیم و به عبارتی محل حضور یونوسیت‌ها را نشان می‌دهد. در تاس‌ماهی ایرانی، این سلول‌ها، هسته‌هایی درشت و گرد داشتند که عمدتاً در بخش قاعده‌ای قرار گرفته بود و فلئورسانس قوی در کل سیتوپلاسم یونوسیت‌ها دیده شد. اگرچه آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase در روی غشای قاعده‌ای جانبی سلول قرار دارد، اما به دلیل چین‌خوردگی و فرورفتگی‌های بسیار زیاد غشای قاعده‌ای-جانبی درون سلول، کل سلول به‌صورت ایمونوفلوئورسانس دیده می‌شود. مشاهدات بر روی ریزساختار یونوسیت‌های تاس‌ماهی ایرانی بیست روزه و یونوسیت‌ها در آبشش ماهیان استخوانی آب شیرین، مبین این امر هستند (Taghizadeh R.A. et al., in press; Chen et al., 2004; Shikano and Fujio, 1998).

در تاس‌ماهی ایرانی، یونوسیت‌ها روی بیش‌تر بخش‌های آبشش‌ها مشاهده شدند. آن‌ها به‌صورت متراکم در پایه تیغه‌های آبششی و در ناحیه بین تیغه‌های آبششی در هر دو سمت رشته‌ها و بر روی هر دو سمت جدار آبششی به‌طور متراکم مشاهده شدند. حضور بافت زاینده تیغه‌های آبششی در رأس رشته آبششی از ویژگی‌های



مشاهده شدند. یونوسیت‌ها با تراکم بالا، اغلب روی سطوح رشته‌های آبششی در ناحیه بین تیغه‌ها و پایه تیغه‌ها مشاهده شدند. با توجه به اهمیت نیاز به جذب یون در محیط‌های آب شیرین که بدن با خطر از دست دادن یون‌های ضروری روبه‌روست، به نظر می‌رسد آبشش‌ها به‌عنوان یک اندام تنظیم اسمزی، در کنار نقش تنفسی و دفعی خود، برای جذب و حفظ یون‌ها در محیط هیپوتونیک فعال هستند.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری (برنامه پژوهشی جندی شاپور و بخش فرهنگی سفارت فرانسه در تهران) اعلام می‌دارد. با همراهی و مساعدت این مرکز، امکانات لازم برای انجام پژوهش فوق فراهم شد.

#### منابع

**Bemis, W.E. and Kynard, B. 1997.** Sturgeon Rivers: an Introduction to Acipenseriformes Biogeography and Life History. In: Sturgeon Biodiversity and Conservation (Eds: V. J. Birstein, J. R. Waldman and W. E. Bemis). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 167-183.

**Beyenbach, K.W. 2004.** Kidneys sans Glomeruli. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 286: 811-827.

**Chang, S.L., Kuo, G.H. and Liao, I.C. 2003.** Salinity Adaptation and Subsidence Attributes in the Early Stages of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Acta Zoologica Taiwanica*, 14(1): 33-44.

**Chen, C., Lin, L. and Lee, T. 2004.** Ionocyte Distribution in Gills of the Euryhaline Milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal, 1775). *Zoological Studies*, 43(4): 772-777.

مختلف یک گونه و نیز در گونه‌های مختلف و در شرایط متفاوت شوری آب محیطی، می‌توان تعداد یونوسیت‌ها را به نیازهای فیزیولوژیک هر مرحله رشد و نمو از یک گونه مرتبط دانست (Khoshnood et al., 2010).

ماهیان فعال‌تر، تعداد بیش‌تری رشته آبششی و نیز رشته‌های آبششی بلندتری دارند که این امر به حضور تعداد بیش‌تری تیغه آبششی روی رشته‌ها منتهی می‌شود (Hughes, 1966). در ماهی *Micropterus dolomieu* (Lacepède, 1802) به وزن ۰/۳۳۲ گرم، متوسط طول رشته‌های آبششی ۲۵۲ میلی‌متر گزارش شده است (Hughes, 1966) که از مقدار مشاهده شده ۱۸۹/۷۷ میکرومتر در تاس‌ماهی ایرانی به وزن ۴۱۷/۳ میلی‌گرم بیش‌تر است. در کل اختلافات درون و بین گونه‌ای واضحی، میان سطوح تنفسی آبشش ماهیان ساکن سطوح مختلف اکولوژیک وجود دارد (Sinha et al., 1991).

در خصوص لارو تاس‌ماهی ایرانی مورد مطالعه، آبشش نیز مانند دیگر اندام‌ها در حال رشد و نمو است و به این ترتیب، دائم به طول کمان‌های آبششی و نیز به تعداد و اندازه رشته‌ها و تیغه‌های آبششی روی آن افزوده می‌گردد. فراوانی یونوسیت‌ها در روی بافت پوششی رشته‌های آبششی در تأیید این فرضیه است که این بخش از بافت آبششی در تبادل یونی فعال است در حالی‌که تیغه‌های آبششی اصولاً در تبادل گازهای تنفسی فعالند و تعداد بسیار کم‌تری یونوسیت روی آن‌ها مشاهده می‌شود (Varsamos et al., 2002).

در مجموع در هر محفظه آبششی، چهار کمان آبششی مشاهده شد که سطوح تنفسی (تیغه‌های آبششی) شکل گرفته در قسمت پایه رشته‌ها و تیغه‌های جوان‌تر در حال رشد و نمو در قسمت رأسی رشته‌ها

- Chloride Cells in Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*, Fry. *Yakhteh Medical Journal*, 11(4): 424-431.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M. 1967.** Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale. Masson et cie Editeurs, Paris, 345 p.
- Nebel, C., Romestand, B., Nègre-Sadargues, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Bacal, J., Bonhomme, F. and Charmantier, G. 2005.** Differential Freshwater Adaptation in Juvenile Sea-bass *Dicentrarchus labrax*: Involvement of Gills and Urinary System. *Journal of Experimental Biology*, 208: 3859-3871.
- Ouattara, N.G., Bodinier, C., Nègre-Sadargues, G., D'Cotta, H., Messad, S., Charmantier, G., Panfili, J. and Baroiller, J. 2009.** Changes in Gill Ionocyte Morphology and Function Following Transfer from Fresh to Hypersaline Waters in the *Tilapia Sarotherodon melanotheron*. *Aquaculture*, 290, 155-164.
- Seidelin, M., Madsen, S.S., Byrialsen, A. and Kristiansen, K. 1999.** Effects of Insulin-like Growth Factor-I and Cortisol on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase Expression in Osmoregulatory Tissues of Brown Trout (*Salmo trutta*). *General and Comparative Endocrinology*, 113: 331-342.
- Shikano, T. and Fujio, Y. 1998.** Immunolocalization of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in the Branchial Epithelium of Chum Salmon Fry during Seawater and Freshwater Acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 201: 3031-3040.
- Shiraishi, K., Kaneko, T., Hasegawa, S. and Hirano, T. 1997.** Development of Multicellular Complexes of Chloride Cells in the Yolk-sac Membrane of *Tilapia (Oreochromis mossambicus)* Embryos and Larvae in Seawater. *Cell Tissue Research*, 288: 583-590.
- Sinha, A.K., Singh, I. and Singh, B.R. 1991.** Gross Structure and Dimensions of the Gills in a Hill-stream Sisorid Catfish, *Glyptothorax pectinopterus*. *Japanese journal of Ichthyology*, 38 (3): 301-305.
- Stoskopf, M.K., 1993.** Fish medicine. Philadelphia. W.B. Saunders Co. p 882.
- Taghizadeh R.A. Z., Khodabandeh, S., Abtahi, B., Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. 2011.** Ultrastructure and Osmoregulatory Function of the Kidney in Larvae of the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Journal of Fish Biology*, 78: 1359-1374.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. and Choe, K.P. 2005.** The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, 85: 97-177.
- Flik, G. and Verbost, P. M. 1993.** Calcium Transport in Fish Gills and Intestine. *Journal of experimental Biology*, 184: 17-29.
- Giffard-Mena, I., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F. and Castille, R. 2006.** Digestive Tract Ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: Implication in Osmoregulation. *Development, Growth & Differentiation*, 48(3): 139-151.
- Hazon, N., Wells, A., Pillans, R.D., Good, J.P., Anderson, W.G. and Franklin, C. E. 2003.** Review: Urea Based Osmoregulation and Endocrine Control in Elasmobranch Fish with Special Reference to Euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 136: 685-700.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N. and Takei, Y. 2003.** Review: Molecular Biology of Major Components of Chloride Cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 136: 593-620.
- Hughes, G.M., 1966.** The Dimensions of Fish Gills in Relation to Their Function. *Journal of Experimental Biology*, 45: 177-195.
- Isiag, S. and Karakisi, H. 1998.** Fine Structure of the Chloride Cell in the Gill Epithelium of *Branchydanio rerio* (Cyprinidae, Teleostei), *Turkish Journal of Veterinary Animal & Sciences*, 22:431-436.
- Khodabandeh, S. and Taghizadeh, Z. 2006.** Immunolocalization of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and ionocytes in gill of Catfish, *Silurus glanis*, *Yakhteh*, 8(29): 45-52. (In Persian)
- 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 Research*, 319: 153-165.
- Khodabandeh, S., Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. 2005b.** Ultrastructural Studies and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase Immunolocalization in the Antennal Urinary Glands of the Lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53 (10): 1203-1214.
- Khoshnood, Z., Khodabandeh, S., Mosafer, S. and Khoshnood, R. 2010.** Effects of Cortisol on Gill

chloride cells in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to freshwater, seawater and doubly-concentrated seawater. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 12-26.

**Varsamos, S., Nebel, C. and Charmatier, G. 2005.** Review: Ontogeny of Osmoregulation in Postembryonic Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141: 401-429.

**Wales, W. and Tytler, P. 1996.** Changes in Chloride Cell Distribution during Early larval Stages of *Clupea harengus*. *Journal of Fish Biology*, 49 (5): 801-814.

**Taghizadeh, R.A.Z., Khodabandeh, S. and Abtahi, B. 2014.** Ontogeny of Gills and Their Osmoregulatory Function in the Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*. *Journal of Applied Ichthyology*, In Press.

**Uchida, K., Kaneko, T., Yamauchi, K. and Hirano, T. 1996.** Morphometrical Analysis of Chloride Cell Activity in the Gill Filaments and Lamellae and Changes in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Activity During Seawater Adaptation in Chum Salmon Fry. *Journal of Experimental Zoology*, 276: 193-200.

**Varsamos, S., Diaz, J.P., Charmantier, G., Flik, G., Blasco, C. and Connes, R. 2002.** Branchial

## Branchial structure and ionocyte abundance in 25DPH larvae of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin 1897

Zahra Taghizadeh Rahmat Abadi<sup>1</sup>, Saber Khodabandeh<sup>2\*</sup> and Behrooz Abtahi<sup>3</sup>

1- M.Sc. Graduated, Faculty of Marine Sciences, Tarbait Modares University, Noor

2- Associate Prof., Faculty of Marine Sciences, Tarbait Modares University, Noor

3- Associate Prof., Faculty of Biology, Shahid Beheshti University, Tehran

Received: 21.05.2013

Accepted: 03.11.2013

\*Corresponding author: skhoda@modares.ac.ir

### Abstract:

The gill Structure and localization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase were examined through branchial arches of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus* larvae (25 days-post-hatched, 417.3 mg). Studies were conducted through light microscopy (H&E Staining) and immunofluorescence for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. Results showed each gill consisted of four complete holobranches and opercular hemibranch. Each filament carried rows of lamellae consisting of a network of interconnecting blood lacunae, which were lined by pillar cell flanges. Pavement cells covered the outermost layer of the lamella and blood cells were found in lacunae. High density of ionocytes (529.73 per mm<sup>2</sup> of the gill tissue) was found at the base of the lamella, in the interlamellar regions, on the filaments and the septums. Ionocytes possessed large size and round basal nuclei. Ionocytes possessed strong immunofluorescence in their cytoplasm, especially in the basolateral sides because of high concentration of the enzyme. The results showed that the main structures of the gill has already been formed at this developmental stage of the Persian sturgeon, and along with its respiratory and excretory roles, it also plays an important role in osmoregulation.

**Key words:** *Acipenser persicus*, Gill, IgGα<sub>5</sub>, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme, Ionocyte