

## Effects of Cortisol on Gill Chloride Cells in Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*, Fry

Zahra Khoshnood, M.Sc.<sup>1\*</sup>, Saber Khodabandeh, Ph.D.<sup>1</sup>, Saeedeh Mosafer, M.Sc.<sup>1</sup>,  
Reza Khoshnood, M.Sc.<sup>2</sup>

1. Marine Biology Department, Faculty of Natural Resources and Marine Science of International Campus of Tarbiat Modares University, Noor, Iran
2. Young Researchers Club, Ahwaz, Iran

\* Corresponding Address: P.O.Box: 64414-356, Marine Biology Department, Faculty of Natural Resources and Marine Science of International Campus of Tarbiat Modares University, Noor, Iran  
Email: zkhoshnood@gmail.com

Received: 6/Jul/2008, Accepted: 19/Apr/2009

### Abstract

**Objective:** cortisol is the major corticosteroid in fish osmoregulation and Persian sturgeon is one of the endangered and economical species of the Caspian Sea sturgeons; this study is one of the first to investigate the effects of cortisol on one species of the Acipenserids species.

**Materials and Methods:** Samples were fixed in Bouin's solution, dehydrated, embedded with paraplast and subsequently sectioned. Immunohistochemical studies were performed by using IgG $\alpha$ 5 and fluorescein isothiocyanate conjugated (FITC) antibodies through fluorescence light microscopy. Measurements of the chloride cells were examined by Image Tools (2.0) image analysis software.

**Results:** In the cortisol treatment there were 492 chloride cells per mm<sup>2</sup> of the gill epithelium which was significantly ( $p = 0.01$ ) higher than the control group (289 chloride cells). The lengths of chloride cells were  $13.9325 \pm 0.5 \mu\text{m}$  and  $16.0935 \pm 0.5 \mu\text{m}$  in the cortisol and control groups, respectively; as reported, the length was significantly smaller in the cortisol group ( $p = 0.02$ ). The widths of the chloride cells were  $7.718 \pm 0.3 \mu\text{m}$  and  $7.922 \pm 0.4 \mu\text{m}$  in the cortisol and control groups which were without any significant differences. Both the dispersion and numbers of chloride cells in four locations (on the filament, basement of the lamellae, interlamellar region and on the lamellae) were significantly different ( $p = 0.01$ ) between the two experimental groups.

**Conclusion:** exogenous cortisol can cause significant cellular and morphometric changes in gills of the Persian sturgeon fry for their adaptation to salinity.

**Keywords:** Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, Cortisol, Gill

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 424-431

## اثرات هورمون کورتیزول بر سلول های کلراید آبششی در *Acipenser persicus* بچه تاسماهی ایرانی

زهرا خوشنود <sup>1</sup>M.Sc.\*، صابر خدابنده <sup>2</sup>Ph.D.، سعیده مسافر <sup>3</sup>M.Sc.، رضا خوشنود <sup>4</sup>M.Sc.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، واحد بین الملل، گروه بیولوژی دریا، نور، ایران  
۲. باشگاه پژوهشگران جوان، اهواز، ایران

\* آدرس نویسنده مسئول: ایران، نور، صندوق پستی: ۳۵۶-۶۴۴۱۴، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، واحد بین الملل، گروه بیولوژی دریا

پست الکترونیک: Email: zkhoshnood@gmail.com

دریافت مقاله: ۸۷/۴/۱۶، پذیرش مقاله: ۸۸/۱/۳۰

### چکیده

**\* هدف:** بررسی اثرات هورمون کورتیزول بر سلول های کلراید آبششی بچه تاسماهی ایرانی (*A. persicus*)  
**\* مواد و روش ها:** ابتدا ماهی های مورد تیمار با هورمون کورتیزول (۵ میلی گرم در لیتر) به صورت محلول در آب قرار گرفتند سپس در محلول بوئن فیکس و پس از مراحل آب گیری توسط پاراپلاست قالب گیری و برش داده شدند. مطالعه ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی های IgGα5 و FITC) Fluorescin Isothiocyanate Conjugated) به کمک میکروسکوپ نوری فلورسنت انجام شد. شمارش و اندازه گیری سلول های کلراید با نرم افزار Image Tools (۲) صورت گرفت.

**\* یافته ها:** در تیمار هورمون کورتیزول در هر ۲ میلی متر مربع از اپی تلیوم آبششی ۴۹۲ سلول کلراید شمارش شد که به طور معنی داری ( $p = 0/01$ ) بیشتر از تیمار شاهد (۲۸۹ سلول کلراید) بود. طول این سلول ها در دو تیمار کورتیزول و شاهد به ترتیب برابر با  $13/9325 \pm 0/5$  و  $16/0935 \pm 0/5$  میکرومتر و به طور معنی دار ( $p = 0/02$ ) در تیمار کورتیزول کمتر بود و عرض آنها به ترتیب برابر با  $7/718 \pm 0/3$  و  $7/922 \pm 0/4$  میکرومتر و بدون اختلاف معنی دار به دست آمد. پراکنش و تعداد سلول های کلراید در چهار موقعیت روی فیلامنت، پایه لاملا، بین لاملاها و روی لاملا در دو تیمار کورتیزول بوده که شاهد دارای اختلاف معنی دار ( $p = 0/01$ ) بوده است.

**\* نتیجه گیری:** هورمون کورتیزول با منشا خارجی می تواند موجب ایجاد تغییرات سلولی و مورفومتریک در بچه تاسماهی ایرانی جهت مواجهه با شوری گردد.

**\* کلیدواژگان:**  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase، کورتیزول، آبشش

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۴، زمستان ۸۸، صفحات: ۴۳۱-۴۴۲

### مقدمه

$Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase است که نقش بسیار مهمی در تبادلات یونی سلول ایفا می کنند (۴، ۵). پمپ سدیم - پتاسیم در تمام سلول های بدن وجود دارد اما میزان حضور آن در سلول های کلراید آبششی به ویژه در غشای قاعده ای - جانبی بسیار زیاد بوده و مکان یابی آنزیم  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase آن به وسیله آنتی بادی های مونوکلونال در مطالعات ایمونوهیستوشیمی به عنوان شاخص برای شناسایی این سلول ها در بافت آبششی به کار می رود (۹-۶). کورتیزول مهم ترین کورتیکوستروئیدی است که توسط بافت درون ریز غده اینترنال (Interrenal) ماهی ها تولید می شود. این هورمون هر دو فعالیت گلوکو کورتیکوئیدی و مینرالو کورتیکوئیدی را از خود نشان می دهد که مهم ترین اثر آن تنظیم اسمزی در ماهیان دریازی است زیرا در نمو سلول های غنی از میتوکندری (سلول های کلراید) نقش دارد (۴). در ماهیان دریازی نقش این هورمون از طریق افزایش تعداد و اندازه سلول های کلراید و افزایش دانسیته و فعالیت آنزیم  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase صورت می گیرد. برخی تحقیقات ثابت کرده است که کورتیزول اثر مهمی بر جذب یون دارد، این امر نشان می دهد که کورتیزول در تنظیم اسمزی، هم در آب شور و هم در آب شیرین

آبشش به دلیل اپی تلیوم ویژه موجود و ارتباط مستقیم با محیط پیرامون، مهم ترین اندامی است که تنظیم اسمزی در آن صورت می گیرد (۱) و مهم ترین جایگاه تبادلات یونی بین بدن و محیط به شمار می رود (۲). در اپی تلیوم آن سلول های کلراید مهم ترین جایگاه تبادلات یونی هستند که این سلول ها علاوه بر تنظیم تعادل اسیدی - بازی مسؤو ل ترشح یون ها در آب شور و جذب یون ها در آب شیرین به شمار می روند (۳). برخی از تغییرات عمده بافتی مانند افزایش تعداد، اندازه و نیز تغییر در پراکنش سلول های کلراید در روند سازگاری ماهی با شوری رخ می دهد. تغییر در میزان و نوع ناقلین سلولی و تغییر در میزان فعالیت این ناقلین از دیگر تغییرات سازشی در آبشش جهت مواجهه با محیط شور به شمار می رود (۴). سلول های کلراید آبششی سلول های بزرگ و استوانه ای شکلی هستند که در سیتوپلاسم خود دارای تعداد زیادی میتوکندری می باشند، این سلول ها دارای شبکه گسترده ای از فرورفتگی ها در غشای قاعده ای - جانبی خود هستند که با شبکه اندوپلاسمی سیتوپلاسمی و نیز با میتوکندری ها مرتبط است، این غشا محل بیان ژن و فعالیت آنزیم هایی نظیر

Bank, University of Iowa, USA)

به علاوه ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) برای ۱۰ لام، (هر لام ۱۰۰ میکرولیتر) به لام ها اضافه گردید. سپس لامها در محفظه مرطوب به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن لامها دو مرتبه هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط محلول PBS شست‌و شو داده شدند. سپس محلول آنتی‌بادی دوم، FITC) Fluorescein Isothiocyanate Conjugated (۱۰ برابر رقیق شده) به صورت ۷ میکرولیتر آنتی‌بادی دوم + ۹۹۳ میکرولیتر محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) برای ۱۰ لام، به هر لام ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. لامها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محفظه مرطوب نگهداری شدند. لامها پس از شست‌وشوی در محلول PBS دو مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط Gel Mount Aqueous (Sigma) مونتاژ شده و توسط میکروسکوپ نوری فلورسنت Olympus (Tokyo, Japan) مورد مطالعه قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در یک‌سری از لام‌های شاهد به جای آنتی‌بادی اول محلول ۱۰ برابر رقیق شده PBS+Regiler اضافه گردید (۷ و ۹). شمارش سلول‌های کلراید با استفاده از تصاویر تهیه شده از مطالعات ایمونوهیستوشیمی صورت گرفت. سلول‌های کلراید در هر تیمار از ۷ ترانسکت تصادفی با ابعاد  $290 \times 366/06$  میکرومتر بر روی برش طولی فیلامنت مورد شمارش قرار گرفتند (۱۲). جهت اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های کلراید در هر تیمار از ۷ ترانسکت تصادفی با ابعاد  $290 \times 366/06$  میکرومتر بر روی برش طولی فیلامنت ۲۰ سلول به صورت تصادفی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (۱۲) که میانگین هر گروه محاسبه و مقایسه شد. کلیه اندازه‌گیری‌ها توسط نرم‌افزار Image Tools (2.0) انجام شد (۱۳). در مقایسه داده‌های مربوط به تعداد کل (فراوانی) سلول‌های کلراید در دو تیمار شاهد و کورتیزول پس از آزمون تعیین نرمالیتی Shapiro-Wilk از آزمون Mann-Whitney U استفاده گردید، به منظور مقایسه تعداد سلول‌های کلراید در موقعیت‌های مختلف بافت آبتشی (روی لاملا، بین لاملاها، روی فیلامنت و در پایه لاملا) از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) جهت هر کدام از تیمارها به صورت جداگانه استفاده گردید. هم‌چنین مقایسه‌ای میان تعداد سلول‌های کلراید در هر کدام از موقعیت‌های بافت آبتشی بین دو تیمار از طریق آزمون Mann-Whitney U انجام گردید. کلیه آزمون‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و (11.5) انجام و مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار از میانگین (Mean  $\pm$  SEM) ارایه داده شد.

پژوهش حاضر، بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، مصوب دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس تهران (۱۳۸۶) می‌باشد.

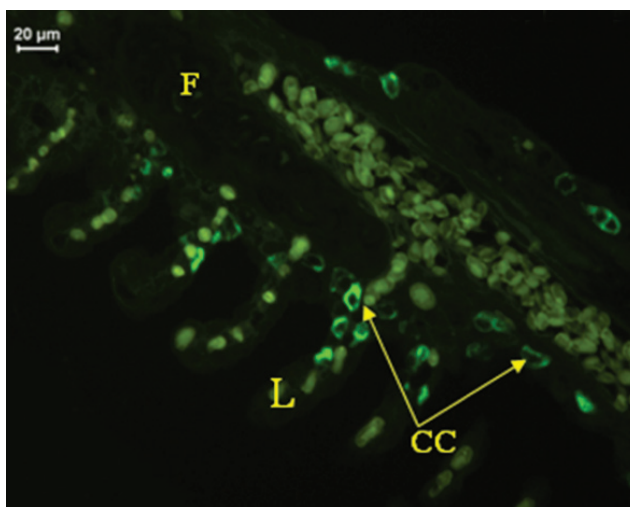
## یافته‌ها

در تیمار شاهد، میانگین تعداد سلول‌های کلراید در چهار موقعیت: روی لاملا، پایه لاملا، بین لاملاها که در سایر بخش‌های فیلامنت (شکل ۱) محاسبه و تعیین گردید که اختلاف میان این میانگین‌ها معنی‌دار (p = ۰/۰۱) بود (نمودار ۱).

می‌تواند نقش داشته باشد (۱۰، ۱۱). تاسماهی ایرانی یکی از ۵ گونه ماهیان غضروفی- استخوانی دریای خزر است که در سواحل جنوبی خزر (سواحل ایران) پراکنش دارد. همه ساله به منظور بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری و تلاش در جهت حفظ آنها از خطر انقراض، تعداد زیادی از بچه ماهیان این نوع توسط کارگاه‌های تکثیر و پرورش به دریا رهاسازی می‌شوند به همین جهت شناخت تنظیم اسمزی و مکانیسم سازگاری با شرایط شوری جدید در رهاسازی این بچه ماهیان به دریا بسیار مهم است. تحقیقات زیادی در خصوص اثرات هورمون کورتیزول بر مکانیسم تنظیم اسمزی در ماهیان استخوانی انجام گرفته اما تاکنون اثر این هورمون بر ماهیان خاویاری مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین از آنجایی که در ماهیان استخوانی کورتیزول سبب القای تحمل شوری به وسیله تغییرات مختلفی در بافت آبتشی می‌شود شاید بتوان بچه ماهیان خاویاری را قبل از رهاسازی با استفاده از کورتیزول به شوری دریای خزر سازش داده و بعد رهاسازی نمود. تاکنون مطالعات کمی در زمینه ساختار آبتش در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی صورت گرفته هم‌چنین هنوز در خصوص مکان‌یابی و مطالعه سلول‌های کلراید با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی و وضعیت آنزیم  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase در ماهیان خاویاری خزر مطالعه‌ای صورت نگرفته است بنابراین مکان‌یابی و مطالعه پراکنش سلول‌های کلراید با استفاده از مکان‌یابی آنزیم  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase در آبتش آنها انجام گرفته است.

## مواد و روش‌ها

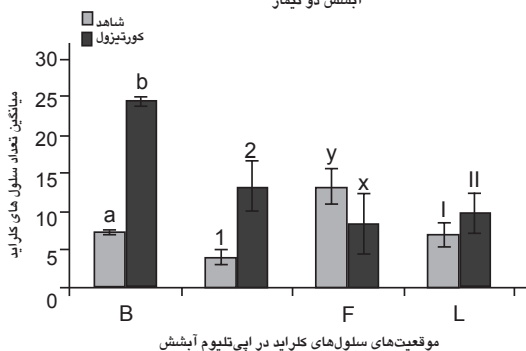
بچه ماهیان ۲-۳ گرمی تاسماهی ایرانی *Acipens er persicus* از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت به دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. بچه ماهیان به مدت ۷ روز جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند (آب هوادهی شده چاه، دما ۲۶-۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۲L : ۱۲D ساعت). آزمایشات با انتقال ۳۰ قطعه بچه ماهی ۲-۳ گرمی به تانک‌های حاوی آب شیرین (تیمار شاهد) و آب شیرین حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر کورتیزول (هر کدام با حجم ۱۰۰ لیتر) به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. آبتش نمونه‌ها به منظور انجام مطالعات ایمونوهیستوشیمی به مدت ۲۴ ساعت در محلول فیکساتیو بوئن فیکس شده و پس از طی مراحل آب‌گیری توسط سری افزایشی الکل اتانول، توسط پاراپلاست قالب‌گیری شدند. برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر توسط میکروتوم از آنها تهیه و بر روی لام‌های پلی-ال-لیزینه قرار گرفت. لام‌ها توسط گزین پارانین زدایی شده و پس از آن توسط سری افزایشی الکل اتانول (۵۰، ۷۰، ۹۰، ۹۵، ۱۰۰) آب‌گیری شدند. پس از آن در محلول PBS) Phosphate Buffer Saline (به مدت ۵ دقیقه شست‌و شو داده شدند، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول PBS+NaCl+Tween20 و نیز به مدت ۲۰ دقیقه در محلول PBS+Regiler قرار داده شد و پس از آن دو مرتبه هر بار به مدت ۳ دقیقه در محلول PBS شست و شو داده شدند. سپس محلول آنتی‌بادی اول (IgGa5) رقیق شده با محلول PBS+Regiler (۱۰ برابر رقیق شده) به صورت ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اول، IgGa<sub>۵</sub> (Mouse Monoclonal Antibody Raised Against the  $\alpha$ -subunit of the Chicken  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, Hybridoma



شکل ۱: تصویر ایمونوهیستوشیمی مکانیابی  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase در سلول‌های کلراید آبششی توسط آنتی‌بادی IgGa5 در تیمار شاهد.

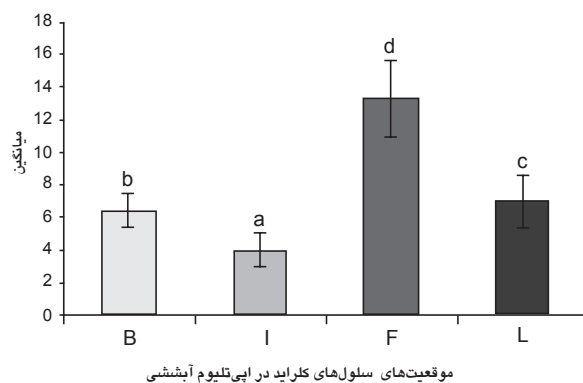
همچنین مقایسه پراکنش سلول‌های کلراید در بخش‌های مختلف آبشش شامل روی لاملا، پایه لاملا، بین لاملاها و در سایر بخش‌های فیلامنت در تیمار هورمون کورتیزول (شکل ۲) نشان داد که بیشترین تعداد سلول‌های کلراید در پایه لاملاها، بین لاملاها، روی لاملاها و در سایر بخش‌های فیلامنت دیده می‌شوند و اختلاف میان میانگین آنها معنی‌دار ( $p = 0/01$ ) می‌باشد (نمودار ۲). مقایسه پراکنش و میانگین تعداد سلول‌های کلراید در موقعیت‌های مختلف بافت آبششی دو تیمار شاهد و کورتیزول نشان داد که این مقادیر دارای اختلاف آماری معنی‌دار نیز ( $p = 0/01$ ) هستند (نمودار ۳).

تعداد و پراکنش سلول‌های کلراید در اپی‌تلیوم آبشش دو تیمار

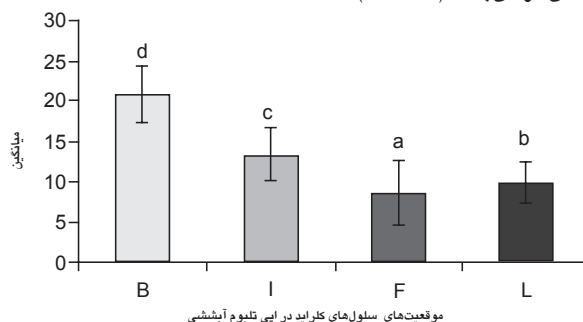


نمودار ۳: مقایسه تعداد و پراکنش سلول‌های کلراید در اپی‌تلیوم آبشش در تیمار شاهد و تیمار هورمون کورتیزول در چهار موقعیت پایه لاملا (B: Basement of the lamellae) بین لاملاها (I: Interlamellar region) روی فیلامنت (F: Filament) و روی لاملا (L: Lamellae). اعداد و حروف متفاوت بر روی ستون‌ها بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p = 0/01$ ).

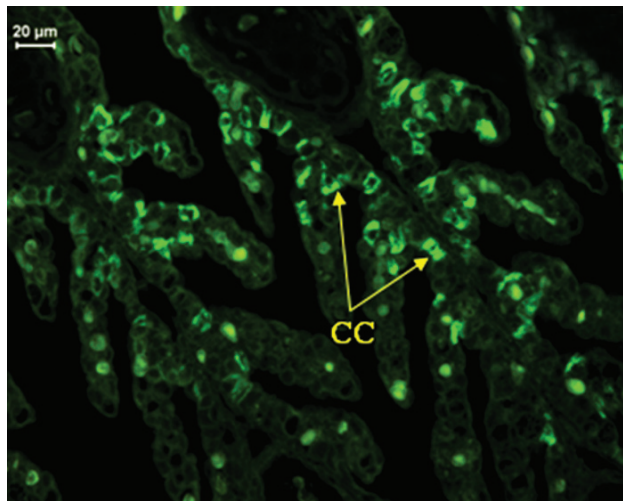
در آبشش بچه ماهی ۳-۲ گرمی تاسماهی ایرانی در هر ۲ میلی‌متر از سطح بافت آبششی ۲۸۹ سلول کلراید شمارش شد. در تیمار هورمون کورتیزول در هر ۲ میلی‌متر از سطح بافت آبششی ۴۹۲ سلول کلراید شمارش گردید.



نمودار ۱: تعداد و پراکنش سلول‌های کلراید در اپی‌تلیوم آبشش در تیمار شاهد. فراوانی سلول‌های کلراید در چهار موقعیت اپی‌تلیوم آبششی: پایه لاملا (B: Basement of the lamellae) بین لاملاها (I: Interlamellar region) روی فیلامنت (F: Filament) و روی لاملا (L: Lamellae) حروف متفاوت بر روی ستون‌ها بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p = 0/01$ ).



نمودار ۲: تعداد و پراکنش سلول‌های کلراید در اپی‌تلیوم آبشش در تیمار کورتیزول. فراوانی سلول‌های کلراید در چهار موقعیت اپی‌تلیوم آبششی: پایه لاملا (B: Basement of the lamellae) بین لاملاها (I: Interlamellar region) روی فیلامنت (F: Filament) و روی لاملا (L: Lamellae) حروف متفاوت بر روی ستون‌ها بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p = 0/01$ ).



شکل ۲: تصویر ایمنو‌هستوشیمی مکان‌یابی  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase در سلول‌های کلراید آبششی توسط آنتی‌بادی  $\text{IgGa5}$  در تیمار هورمون کورتیزول. در هر دو تیمار سلول‌های کلراید در چهار موقعیت روی فیلامنت، در پایه لاملا، بین لاملاها و بر روی لاملا مورد شمارش قرار گرفتند. (CC: Chloride Cell; F: Filament; L: Lamellae).

در تیمار شاهد، سلول‌های کلراید دارای میانگین طولی برابر با  $16/0935 \pm 0/5$  میکرومتر و میانگین عرضی معادل  $7/922 \pm 0/4$  میکرومتر و در تیمار هورمون کورتیزول دارای میانگین طولی  $13/9325 \pm 0/5$  میکرومتر و میانگین عرضی برابر با  $7/718 \pm 0/3$  میکرومتر بودند.

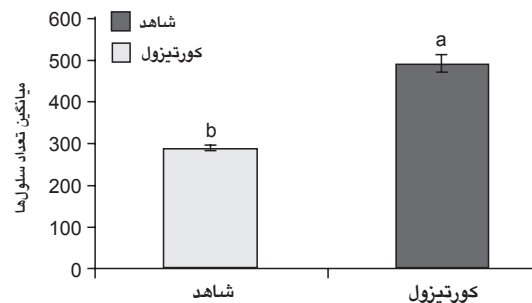
میانگین عرض سلول‌ها در دو تیمار، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار و طول سلول‌ها بین دو تیمار دارای اختلاف معنی‌دار بوده ( $p = 0/02$ ) به طوری که به نظر می‌رسد سلول‌ها در تیمار آب حاوی کورتیزول، کوچک‌تر شده‌اند (نمودار ۵).

### بحث

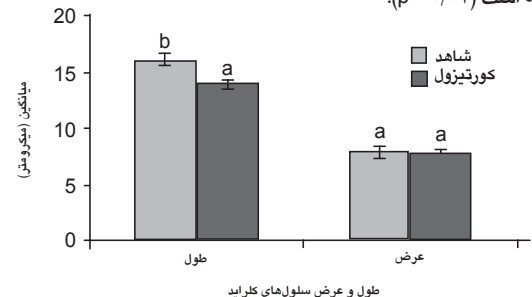
در مطالعات مربوط به شمارش سلول‌های کلراید در بافت آبششی گونه‌های مختلف ماهیان، در هر ۲ میلی‌متر مربع از بافت آبشش مارماهی ژاپنی، *Anguilla japonica* (۵۰۰ گرمی)، ۱۰۰۶ سلول کلراید (۱۴)، در آبشش باس دریایی، *Dicentrarchus labrax* (۲۴۰ گرمی)، ۶۲۵۰ سلول کلراید (۱۳)، در آبشش تیلاپای موزامبیک، *Oreochromis mossambicus* (۶۵ گرمی)، ۶۲۳۳ سلول کلراید (۱۵)، در آبشش خامه ماهی، *Chanos chanos* (۳۱ گرمی)، ۴۰۰ سلول (۱) و در آبشش سالمون آتلانتیک، *Salmo salar* (۲۵ گرمی)، ۱۲۰ سلول کلراید (۱۲) گزارش شده است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر (۲۸۹ سلول کلراید در تیمار شاهد) به نظر می‌رسد تعداد سلول‌های کلراید در بافت آبششی در گونه‌های مختلف، در ماهی‌های با اندازه‌های مختلف با توجه به میزان فعالیت‌های فیزیولوژیک در سنین و اوزان مختلف متفاوت می‌باشد.

میانگین طول سلول‌های کلراید در تیمار شاهد  $16/0935 \pm 0/5$  میکرومتر و میانگین عرض آنها  $7/922 \pm 0/4$  میکرومتر به دست آمد، این در حالی است که ابعاد سلول‌های کلراید در آبشش *Acipenser naccarii* با طول ۱۸ میکرومتر و عرض ۱۲ میکرومتر (۱۶) و طول سلول‌های کلراید در آبشش *Dicentrarchus la-brax* و مارماهی ژاپنی، *Anguilla japonica* و خامه ماهی، *Chanos chanos*، به ترتیب ۱۰ میکرومتر، ۱۱/۶ میکرومتر و

میانگین تعداد کل سلول‌های شمارش شده در ماهیان تیمار شده با هورمون کورتیزول با تعداد کل سلول‌های شمارش شده در تیمار شاهد مورد مقایسه قرار گرفت و مشخص شد که تعداد سلول‌های کلراید آبششی در ماهیان تیمار شده با هورمون کورتیزول به طور معنی‌داری ( $p = 0/01$ ) نسبت به ماهیان تیمار شاهد افزایش یافته است (نمودار ۴).



نمودار ۴: مقایسه تعداد کل سلول‌های کلراید در اپی‌تلیوم آبشش در تیمار شاهد و تیمار هورمون کورتیزول. تعداد سلول‌های کلراید در تیمار هورمون کورتیزول به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته است ( $p = 0/01$ ).



نمودار ۵: مقایسه ابعاد سلول‌های کلراید در اپی‌تلیوم آبشش در تیمار شاهد و تیمار هورمون کورتیزول. طول سلول‌های کلراید در تیمار هورمون کورتیزول نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌دار ( $p = 0/02$ ) کاهش یافته است اما در مورد عرض سلول‌ها تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

۱۰ میکرومتر گزارش شده است (۱۳، ۱۴ و ۱۷). شاید بتوان گفت همانند تعداد سلول‌های کلراید، اندازه آنها نیز یک فاکتور وابسته به گونه بوده و در گونه‌های مختلف به دلیل نیازهای متفاوت فیزیولوژیک متفاوت است. اندازه بزرگ سلول‌های کلراید در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی سازگار با آب شیرین با حضور قابل ملاحظه آنزیم  $\text{Na}^+$ ،  $\text{K}^+$  ATPase توانایی بالای این ماهیان را در جذب فعال یون‌های آب اطراف آبشش‌ها نشان می‌دهد.

در تیمار هورمون کورتیزول تعداد سلول‌های کلراید در کل بافت آبششی نسبت به تیمار شاهد به طور چشم‌گیری افزایش یافته که این افزایش بیان‌کننده تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد. در زمینه بررسی اثرات هورمون کورتیزول بر آبشش ماهیان *Acipenser* (تاسماهیان یا ماهیان خاویاری) تاکنون پژوهشی صورت نگرفته است اما پلیس و مک کورمیک با مطالعه اثرات هورمون کورتیزول بر آبشش سالمون آتلانتیک، *Salmo salar* بیان داشتند که این هورمون موجب افزایش تعداد سلول‌های کلراید آبششی نسبت به تیمار شاهد می‌گردد (۱۲). یوچیدا و همکاران در مطالعه گیرنده‌های هورمون کورتیزول در آبشش *Oncorhynchus keta* بیان داشتند که گیرنده هورمون کورتیزول هم در سلول‌های کلراید لاملاهی و هم در سلول‌های کلراید فیلامنتی دیده می‌شود و بیان ژن گیرنده کورتیزول در سلول‌های کلراید فیلامنتی در ماهیان سازگار با آب دریا به مراتب بیشتر از میزان آن در ماهیان سازگار با آب شیرین است. همچنین این گیرنده در سلول‌های تمایز نیافته بین لاملاهی مشاهده شد که نشان می‌دهد هورمون کورتیزول نه تنها در تنظیم عملکرد سلول‌های کلراید بلکه در تنظیم تمایز آنها نیز نقش دارد (۱۸). نتایج مطالعات دیگری نیز افزایش در تعداد سلول‌های کلراید آبششی را پس از تیمار با هورمون کورتیزول نشان می‌دهد (۵، ۲۱-۱۹)؛ نتایج این محققین بیانگر این نکته است که هورمون کورتیزول با منشاء خارجی، همانند کورتیزولی که از غده اینترنال خود ماهی ترشح می‌شود، می‌تواند تکثیر و تمایز سلول‌های کلراید را در جهت آمادگی ماهی در مواجهه با شوری تحریک کند. از سوی دیگر تعداد سلول‌های کلراید در *Anguilla japonica* که به مدت ۱۰ روز مورد تیمار با هورمون کورتیزول قرار گرفته بود به ترتیب بیشتر از این میزان در ماهیانی بود که به مدت ۵ روز و ۲ روز مورد تیمار قرار گرفته بودند (۱۴). این امر نشان می‌دهد که اثرات هورمون کورتیزول بر تکثیر و تمایز سلول‌های کلراید می‌تواند به زمان تیمار این هورمون نیز وابسته باشد. در مطالعه حاضر در تیمار هورمون کورتیزول، بیشترین تعداد سلول‌های کلراید در پایه لاملاها و پس از آن به ترتیب در فضای بین لاملاهی، بر روی لاملاها و در نهایت در سایر بخش‌های فیلامنت وجود داشته است. مقایسه این پراکنش با ماهیان تیمار شاهد نشان می‌دهد که در تمام بخش‌های مورد مطالعه تغییرات سلولی دارای تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد؛ بدین صورت که هورمون کورتیزول سبب افزایش سلول‌های کلراید در پایه لاملاها، بین لاملاها و روی لاملاها شده است در حالی که در تیمار شاهد بیشترین تعداد سلول‌های کلراید در سایر بخش‌های فیلامنت مورد شمارش قرار گرفته است. پیدایش سلول‌های کلراید لاملاهی در *Oreochromis mossambicus* (۲۲) و همچنین افزایش تعداد این سلول‌ها در لاملاهای ماهیانی مانند

*Salmo gairdneri* و *Oncorhynchus kisutch* (۲۳) و *Ictalurus nebulosus* و *Oncorhynchus mykiss* (۱۹، ۲۴) در تیمار غلظت‌های مختلفی از کورتیزول نیز گزارش شده است. اگرچه در برخی از گونه‌ها مانند سالمون آتلانتیک اثرات این هورمون برعکس دیده شده (۱۲) یا تاثیری بر پراکنش سلول‌های کلراید در ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای نداشته است (۲۱). فضای بین لاملاها، روی لاملاها و در پایه لاملاها از مهم‌ترین مکان‌های مواجهه سلول‌های اپی‌تلیوم آبششی با آب پیرامونی محسوب می‌گردند و افزایش سلول‌های کلرایدی که در این موقعیت‌ها قرار دارند توسط هورمون کورتیزول می‌تواند بیانگر نقش انتخابی هورمون کورتیزول در مورد موقعیت‌های قرارگیری سلول‌های کلراید باشد بدین معنی که این هورمون، سلول‌های کلراید را در موقعیت‌هایی از بافت آبششی افزایش می‌دهد تا بتواند بیشترین کارایی را در تبادلات یونی ایفا کنند.

طول سلول‌های کلراید در تیمار هورمون کورتیزول  $13/9325 \pm 0/5$  میکرومتر و عرض آنها  $7/718 \pm 0/3$  میکرومتر به دست آمد، مقایسه این ابعاد با تیمار شاهد نشان داد که سلول‌های کلراید در تیمار هورمون کورتیزول تا حدودی کوچک‌تر شده‌اند. نتایج تحقیقات در ماهیان استخوانی (تلتوست) مثل *Oncorhynchus mykiss*، *Salmo trutta* (۲۰)، *Anguilla japonica* (۱۴) و *Salmo salar* (۱۲) عکس نتایج تحقیق حاضر است.

کاهش معنی‌دار طول سلول‌های کلراید در تیمار کورتیزول در مقایسه با تیمار شاهد در تاسماهی ایرانی در مقابل افزایش تعداد آنها، می‌تواند تایید‌کننده این نکته باشد که در این گونه، هورمون کورتیزول با وجود کاهش اندازه سلول‌های کلراید در برابر افزایش تعداد و تنوع آنها در جهت تعدیل اسمزی تلاش می‌کند، بدین مفهوم که هرچند اندازه این سلول‌ها کاهش یابد اما میزان ایمونوفلورسانس ناشی از حضور  $\text{Na}^+$ ،  $\text{K}^+$ -ATPase در آنها نسبت به تیمار شاهد کمتر به نظر نمی‌رسد و به این صورت نیست که این سلول‌های کوچک‌تر توانایی کمتری در تنظیم اسمزی نسبت به سلول‌های بزرگ‌تر داشته باشند. از سوی دیگر شاید از دلایل کوچک‌تر شدن اندازه سلول‌های کلراید در تیمار هورمون کورتیزول در برابر افزایش تعداد آنها این نکته باشد که بچه ماهیان مطالعه حاضر تنها به مدت ۲۴ ساعت مورد تیمار با این هورمون قرار گرفته‌اند و تاثیر تیمار هورمونی تنها در جهت افزایش تعداد آنها به منظور مواجهه با شوری احتمالی بوده است. شاید اگر مدت زمان تیمار هورمون کورتیزول افزایش می‌یافت، سلول‌ها این امکان را پیدا می‌کردند که به افزایش ابعاد خود نیز پردازند. از سوی دیگر می‌توان گفت که تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای در مورد اثرات هورمون کورتیزول با منشا خارجی بر ماهیان غضروفی - استخوانی (تاسماهیان یا ماهیان خاویاری) صورت نگرفته است و تمام مطالعات موجود جهت مقایسه نتایج پژوهش حاضر مربوط به ماهیان استخوانی می‌باشد، در حقیقت ممکن است بخشی از رفتار هورمون کورتیزول و اثرات آن بر فیزیولوژی تنظیم اسمزی ماهیان غضروفی - استخوانی متفاوت از عملکرد آن در ماهیان استخوانی باشد بدین معنی که در ماهیان استخوانی موجب افزایش اندازه سلول‌ها و در ماهیان غضروفی - استخوانی موجب کاهش اندازه آنها گردد. به هر جهت این امر نیازمند مطالعات بیشتر و کامل است.

در غشای راسی و مسیرهای پاراسلولی سدیم صورت می‌گیرد. همچنین این امر نشان می‌دهد که این بچه ماهیان نسبت به هورمون کورتیزول با منشا خارجی پاسخ داده و چنین هورمونی همان طور که در مورد سایر ماهیان بیان شده است سبب ایجاد تغییرات مورفولوژیک، مورفومتریک و بیوشیمیایی در بافت آبششی در جهت آمادگی ماهی در مواجهه با شوری می‌گردد. بنابراین شاید بتوان با تیمار ۲۴ ساعته هورمون کورتیزول در فاصله زمانی رهاسازی به دریا، آمادگی بچه ماهیان را برای مواجه شدن با انواع استرس‌های زمان رهاسازی به خصوص شوری را بالا برد.

### تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های مالی انجام این پژوهش توسط دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس تهران حمایت گردیده است.

### References

- Lin YM, Chen CN, Lee TH. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brakishwater and freshwater. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003; 135(3): 489-497.
- Evans DH. Osmoregulation. In: Evans DH (ed). *The physiology of fishes*. Boca Raton: CRC Press; 1993; 157-176.
- Wood CM, Marshall WS. Ion balance, acid-base regulation, and chloride cell function in the common killifish, *Fundulus heteroclitus* a euryhaline estuarine teleosts. *J Estuaries*. 1994 (17): 34-52.
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev*. 2005; 85: 97- 177.
- McCormick SD. Fluorescent Labelling of in Intact Cell by Use of Flurecent Drivitive of Ouabain: Salinity and Teleost Chloride Cells. *Cell Tissue Res*. 1990; 260: 529-553.
- Hirose S, Kaneko T, Natio N, Takei Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2003; 136(4): 593-620.
- Lignot JH, Susanto GN, Charmantier-Daures M, Charmantier G. Immunolocalization of Na, K-ATPase in the Branchial Cavity during the Early Development of the Crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res*. 2005; 319: 331-339.
- Nebel C, Romestand B, Negre-Sadargues G, Grousset E, Aujoulat F, Bacal JF, et al. Differential Freshwater Adaptation in Juvenile Sea-bass, *Dicentrarchus labrax*: Involvement of Gills and Urinary System. *J Exp Biol*. 2005; 208(pt 20): 3859-3871.
- Khodabandeh S. Na, K-ATPase in the gut of the zygoptera *Ischnura elegans*, and anisoptera, *Libellula lydia* larvae (odontata): Activity and immunocytochemical localization. *Zool Stud*. 2006; 45: 53-63.
- Mancera JM, Carrion RL, Martin del Rio MP. Osmoregulatory action of PRL, GH and Cortisol in the gilt-head Sea bream (*Sparus aurata* L.). *Gen Comp Endocrinol*. 2002; 129: 95-103.
- Varsamos S, Nebel C, Charmantier G. Ontogeny of osmoregulation in post-embryonic fish: A Review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2005; 141: 401-429.

### نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد بر خلاف اینکه هورمون کورتیزول را با انجام تغییرات مناسب مقاومت در برابر افزایش شوری بالا می‌برد، عملکرد این هورمون در مورد اندازه سلول‌های کلراید در آبشش ماهیان غضروفی- استخوانی تا حدودی می‌تواند متفاوت با عملکرد آن در ماهیان تلئوست باشد. در مجموع در تیمار کورتیزول، افزایش تعداد سلول‌های کلراید، نشان از فعالیت هورمون کورتیزول در روند سازگار کردن ماهی به محیط با شوری بالاتر می‌باشد، زیرا ماهی در صورت ورود به محیطی پرغلظت نیاز به دفع فعال مقادیر زیادی یون دارد که این دفع فعالانه به طور مشخص از طریق همکاری  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase و NKCC ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -2Cl<sup>-</sup>) در غشای قاعده‌ای- جانبی با یکدیگر و در ارتباط با کانال‌های کلر (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

- Pelis MR, McCormick SD. Effects of growth hormone and cortisol on Na-K-2Cl co transporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *Gen Comp Endocrinol*. 2001; 124: 134-143.
- Varsamos S. Tolerance Range and Osmoregulation in Hypersaline Conditions in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Mar Biol Asso U.K.* 2002; 82: 1047-1048.
- Wong CK, Chan DK. Effects of Cortisol on chloride cells in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J Endocrinol*. 2001; 168(1): 185-192.
- Heijden A, Verboost P, Eygensteyn J, Li J, Bonga S, Flik G. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to freshwater or seawater: quantification by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Biol*. 1997; 200 (pt 1): 55-64.
- Carmona R, Garcia-Gallego M, Sanz A, Domezaín A, Ostos-Garrido MV. Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. *J Fish Biol*. 2004; 64: 553-566.
- Chen CN, Lin LY, Lee TH. Ionocyte distribution in gills of the Euryhaline milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal, 1775). *Zool Stud* 2004; 43: 772-777.
- Uchida K, Kaneko T, Yamauchi K, Hirano T. Morphometrical analysis of chloride cells in the gill filaments and lamellae and changes in activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *Exp Zool*. 1996; 276: 193-200.
- Laurent P, Perry SF. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res*. 1990; 259: 429-442.
- Madsen SS. Effect of repetitive cortisol and thyroxine injections on chloride cell number and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in gills of freshwater acclimated rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 1990; 95: 171-175.
- Seidelin M, Madsen SS, Bryalsen A, Kristiansen K. Effects of insulin-like growth factor-I and cortisol on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase expression in osmoregulatory tissues of Brown trout, (*Salmo trutta*). *Gen Com Endocrinol*. 1999; 113: 331- 342.
- Dang Z, Balm PH, Flik G, Wendelaar Bonga SE, Lock RA. Cortisol Increases Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase density in Plasma Membranes of Gill Chloride Cells in the Fresh-

- water *Tilapia Oreochromis mossambicus*. *J Exp Biol.* 2000; 203: 2349- 2355.
23. Richman NH, Zaugg WS. Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre- and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol.* 1987; 65: 189-198.
24. Bindon SD, Fenwick JC, Perry SF. Branchial chloride cell proliferation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: implications for gas transfer. *Can J Zool.* 1994; 72: 1395-1402.
25. Goss G, Perry S, Laurent P. Ultrastructural and morphometric studies on ion and acid-base transport processes in freshwater fish. In: Wood CM and Shuttleworth AD (eds). *Cellular and molecular approaches to fish ions regulation*. Oxford: Academic Press; 1995; 257-284.
-