Original Article

Mitochondria Rich-Cells Localization and Effect of Salinity on their Distribution in Kidney Tubules of Persian Sturgeon *Acipenser persicus*

S. Mosafer Khorjestan, M.Sc., S. Khodabandeh, Ph.D.*, Z. Khoshnood, M.Sc.

Marine Biology Department, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

** Corresponding Address: P.O.Box: 64414-356, Marine Biology Department, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*
Email: Surp78@yahoo.com

Abstract

Received: 18/Dec/2007, Accepted: 13/May/2008

Objective: The urinary system of euryhaline fish, as well as the gills, is involved in ion regulation through the production of dilute urine in freshwater and isotonic urine in seawater. The low osmolality of the urine originates from an active reabsorption of ions by Ionocytes or mitochondria rich-cells (MRCs) present in certain parts of the urinary system. Mitochondria rich-cells possess a high density of Na^+, K^+-ATPase.

Materials and Methods: Persian Sturgeon fry's, adapted to freshwater and diluted Caspian Sea water (‰5 salinity) were fixed in Bouin's solution after 24h. After the hydration with ethanol, the samples were paraffinaized and sectioned. Light microscopy and Hematoxiline-Fushin staining were used for histological examinations. Immunolocalization of Na^+, K^+-ATPase was observed through fluorescent microscopy (450-490 µm), using $IgG\alpha_5$ (as primary antibody) and FITC (as secondary antibody).

Results: In both experimental conditions, maximum immunofluorescence of Na^+, K^+-ATPase (in mitochondria rich-cells) was found in distal and collective tubules. In both ureter and urinary bladder, immunostainings were found in dispersed cells with relatively weak intensity. In ‰5 acclimated fish, weak immunofluorescence was also observed in neck segment and proximal tubules, as well as in distal and collective tubules.

Conclusion: Alternation in mitochondria rich-cells and Na^+, K^+-ATPase distribution in kidney tubules of ‰5 acclimated fry's showed that the blood and osmolytes were nearly isotonic to environment but not isoionic. Thus the fish needs the absorption and excretion of some ions for the body homeostasis and osmoregulation.

Keywords: Na^+, K^+-ATPase, Immunohistochemistry, Kidney Tubules, Sturgeon

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 4, Winter 2009, Pages: 280-287

مکان یابی و بررسی اثر شوری بر نحوه پراکنش سلول‌های غنی از میتوکندری در توبول‌های کلیوی بچه تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus*

سعیده مسافر خورجستان .M.Sc، صابر خدابنده .Ph.D*، زهرا خوشنود .M.Sc

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، نور، صندوق پستی: ۳۵۶-۶۴۴۱۴، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی
پست الکترونیک: Email: Surp78@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۹/۲۷، پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۴

* **هدف:** مکان‌یابی و بررسی اثر شوری بر نحوه پراکنش سلول‌های غنی از میتوکندری در توبول‌های کلیوی بچه تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، به روش ایمونوهیستوشیمی آنزیم Na^+, K^+-ATPas

* **مواد و روش‌ها:** بچه تاس‌ماهیان ایرانی سازگار شده به آب شیرین و مواجه شده با آب رقیق شده دریای خزر با شوری ۵ گرم در لیتر پس از ۲۴ ساعت در محلول بوئن تثبیت شدند. نمونه‌های تثبیت شده، پس از آب‌گیری در داخل پارافین قالب‌گیری و برش داده شدند. برای بررسی‌های بافت‌شناسی، برش‌ها با هماتوکسیلین-فوشین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی از $IgG\alpha_5$ (آنتی کور اول) و FITC (آنتی کور دوم)، پس از طی مراحل آماده‌سازی جهت مشاهده سلول‌های غنی از میتوکندری به کمک میکروسکوپ نوری فلورسنت با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر استفاده شد.

* **یافته‌ها:** سلول‌های غنی از میتوکندری به دلیل داشتن مقادیر بالایی از آنزیم Na^+, K^+-ATPase در بخش قاعده‌ای جانبی خود قابل شناسایی توسط روش ایمونوفلورسانس این آنزیم هستند. مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان داد که در هر دو تیمار بیشترین میزان ایمونوفلورسانس در توبول‌های دیستال و توبول‌های جمع‌کننده ادرار وجود داشت. در میزنای و کیسه ادراری ایمونوفلورسانس ضعیفی به صورت سلول‌های پراکنده مشاهده شد. در تیمار ۵ گرم در لیتر علاوه بر توبول‌های دیستال و توبول جمع‌کننده، ایمونوفلورسانس ضعیفی در توبول‌های پروکسیمال مشاهده شد.

* **نتیجه گیری:** سلول‌های غنی از میتوکندری که دارای مقادیر بالایی از آنزیم Na^+, K^+-ATPase هستند، در توبول‌های کلیوی با تراکم بالایی وجود دارند. با توجه به تغییرات ایجاد شده در نحوه پراکنش آنزیم Na^+, K^+-ATPase در توبول‌های کلیوی بچه ماهیان تیمار ۵ گرم در لیتر نسبت به نمونه‌های شاهد، می‌توان به این نتیجه رسید که خون و مایعات بدن با آب محیط ممکن است حالت ایزوتونیک داشته باشد ولی حالت ایزویونیک ندارد بنابراین لازم است برخی از یون‌ها از بدن دفع و یا باز جذب شوند.

* **کلیدواژگان:** آنزیم Na^+, K^+-ATPase، ایمونوهیستوشیمی، توبول‌های کلیوی، تاس‌ماهی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره٤، زمستان ۸۷، صفحات: ۲۸۷-۲۸۰

مقدمه

شوری از فاکتورهای کلیدی است که حیات، متابولیسم و پراکنش ماهی را در جریان روندهای رشد و نمو تحت تاثیر قرار می‌دهد. ماندگاری یک گونه ماهی در شرایط خاص محیطی به میزان توانایی تطابق بدنی آن با شوری محیطی در مراحل مختلف زندگی بسیار وابسته است (۱). جانداران برای بقای سلول‌های بدن به تنظیم ترکیب اسمزی مایعات خارج سلولی (خون، لنف و مایعات بین سلولی) نیازمندند. تنظیم اسمزی (Osmoregulation) کنترل غلظت الکترولیت‌ها و مواد آلی حل شده در مایعات بدن و حفظ و نگهداری تعادل آب و نمک‌هاست (۲). 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 یون و بازجذب یون با توجه به شوری و اسمولالیته محیط آبی اعمال می‌کند (۳). با توجه به مطالعات انجام شده، ساختار کلیه ماهیان مطابق با تغییرات شوری محیط تغییر می یابد که این تغییرات با عملکردهای متفاوت تنظیم یونی در کلیه است (۴، ۵).

مطالعات نشان داده است اپی‌تلیوم توبول‌های کلیوی اغلب ماهیان دارای سلول‌های یونوسیت (Ionocyte) یا سلول‌های غنی از میتوکندری هستند (Mitochondria Rich-Cells) که فعالیت بالایی در ترشح یون‌های دو ظرفیتی و بازجذب یون‌های تک ظرفیتی دارند. پراکنش و نحوه فعالیت این سلول‌ها در گونه‌های مختلف ماهیان و همچنین بسته به اسمولاریته محیط متفاوت است (۵). سلول‌های غنی از میتوکندری توبول‌های کلیوی مانند سلول‌های کلراید در آبشش، دارای شبکه گسترده‌ای از فرورفتگی‌ها در غشای قاعده‌ای-جانبی هستند که این فرو رفتگی‌ها محل استقرار ناقلین مختلف یونی به ویژه پمپ سدیم-پتاسیم حاوی آنزیم Na^+, K^+-ATPase است. علاوه بر این، در سیتوپلاسم این سلول‌ها تعداد زیادی میتوکندری که با فرو رفتگی‌های غشای قاعده‌ای-جانبی در ارتباط است، وجود دارد. این میتوکندری‌ها ATP مورد نیاز آنزیم Na^+, K^+-ATPas را فراهم می‌کنند. این سلول‌ها به دلیل غنی بودن از آنزیم Na^+, K^+-ATPase با روش ایمونوهیستوشیمی این آنزیم، قابل مکان‌یابی هستند (۶).

پمپ سدیم-پتاسیم یکی از مهمترین ناقلین سلولی محسوب

می‌شود. این پمپ از دو زیر واحد کاتالیتیک α با وزن ملکولی حدود ۱۰۰ کیلودالتون و دو زیر واحد همراه β با وزن ملکولی حدود ۵۵ کیلودالتون تشکیل شده است (۷). این پمپ انرژی و گرادیان الکتروشیمیایی لازم برای ترشح و جذب یون از خلال غشاهای اپی‌تلیالی را از جابه‌جایی ۳ یون سدیم با ۲ یون پتاسیم برخلاف شیب الکتروشیمیایی و به ازای هیدرولیز هر ملکولATP فراهم می‌کند (۸). حضور این پمپ در غشای سلول‌ها نه تنها برای حفظ حالت هموستازی، پتانسیل غشا و حجم سلول اهمیت دارد بلکه برای تامین نیروی لازم در بسیاری از نقل و انتقالات یونی توسط سایر ناقلین نیز لازم و ضروری است (۹).

از مکان یابی ایمنیایی آنزیم Na^+, K^+-ATPase به عنوان روشی برای شناسایی سلول‌های یونوسیت (سلول‌های غنی از میتوکندری) از سایر سلول‌ها و همچنین برای پی بردن به تغییرات تعداد، اندازه و نحوه پراکنش آنها در بافت‌های مختلف، برای پی بردن به توان تنظیم اسمزی آنها، استفاده شده است (۱، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲). نظر به تولید و رهاسازی سالیانه میلیون‌ها بچه تاس‌ماهی خاویاری در جهت حفظ ذخایر آنها در دریای خزر، مطالعه اندام های تنظیم اسمزی و اثرات شوری‌های نزدیک به شوری مصب رودخانه‌ها بر عملکرد این اندام‌ها لازم و ضروری است. لذا مطالعه حاضر به منظور پی بردن به: ۱. امکان استفاده از آنتی کور $IgG\alpha_5$ در تاس‌ماهیان به عنوان ماهیان بسیار قدیمی، ۲. مکان‌یابی سلول‌های یونوسیت در بخش‌های مختلف دستگاه ادراری، ۳. پی بردن به توان تنظیم اسمزی بچه ماهیان در این اندازه هنگام مواجه شدن آنها با شوری محیط، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی

بچه ماهیان ۳-۲ گرمی تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* در تیرماه ۸۵ از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت گرفته شده و به آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند و به مدت ۷ روز به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. انجام آزمایش‌ها با انتقال ۳۰ بچه ماهی به هر کدام از تانک‌های آزمایشی، حاوی آب شیرین (تیمار شاهد)، آب رقیق شده دریای خزر با شوری ۵ گرم در لیتر صورت گرفت. تعداد ۶ قطعه ماهی (پس از جدا کردن سرو خارج کردن دستگاه گوارش) از هر تیمار به طور تصادفی انتخاب و به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن (۷۵ سی‌سی اسید پیکریک اشباع در آب +۲۰ سی‌سی فرمالین + ۵ سی‌سی اسیداستیک) تثبیت شدند.

بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی

نمونه‌ها بعد از ۲۴ ساعت از بوئن خارج و در الکل اتانول ۷۰درصد قرار داده شدند. برای از بین بردن بقایای رنگ زرد بوئن از روی نمونه‌ها، به کرات در الکل اتانول ۷۰ درصد شست‌وشو داده شدند. سپس جهت آب‌گیری نمونه‌ها، به ترتیب در الکل ۹۰ درصد (یک ساعت) الکل ۹۵ درصد (یک ساعت) الکل ۱۰۰ درصد (یک ساعت) و در نهایت در الکل بوتانل (۱۲ ساعت) قرار داده شدند. نمونه‌ها سه مرتبه، هر بار ۲ ساعت داخل پارافین مایع واقع در اون قرار داده شده و در نهایت در پارافین قالب‌گیری شدند. از قالب‌ها به وسیله میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۳ میکرومتر تهیه و روی لام‌های معمولی قرار داده شدند. برای مطالعه ساختار بافت‌شناسی توبول‌های کلیوی، لام ها به وسیله هماتوکسلین-فوشین رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

مکان‌یابی سلول‌های غنی از میتوکندری و در واقع آنزیم Na^+, K^+-ATPase با استفاده از $IgG\alpha_5$ (آنتی کور اول)
(Mouse Monoclonal Antibody Raised Against the α-subunit of the Chicken Na^+, K^+-ATPase; Hybridoma Bank, University of Iowa, USA),
و FITC (آنتی کور دوم)
(Fluorescein Isothiocyanate; Monoclonal Mouse Anti-florescein Antibody; Merck Germany)

و میکروسکوپ نوری فلورسنت با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Lignot و همکارانش (۹) و خدابنده و تقی زاده (۱۲) انجام شد. برای این منظور از سری برش‌های تهیه شده برای بافت شناسی به طور یک در میان برش‌های به ضخامت ۳ میکرومتر روی لام هایی با پوشش Poly-L-Lysin قرار داده شدند. سپس توسط گزیلن پارافین‌زدایی شده و توسط سری افزایشی الکل اتانول (۵۰، ۷۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) آب‌گیری شدند. پس از آن در محلول Phosphate Buffer Saline (PBS) به مدت ۵ دقیقه شست و شو داده شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در محلول PBS+NaCl+Tween20 و نیز به مدت ۲۰ دقیقه در محلول PBS+Regiler قرار گرفتند و پس از آن دو مرتبه و هر بار به مدت ۳ دقیقه در محلول PBS شست و شو داده شدند. سپس محلول آنتی کور اول ($IgG\alpha_5$) رقیق شده با محلول PBS+Regile (۱ درصد) به صورت ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌کور اول+۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS+Regiler برای ۱۰ لام، هر لام ۱۰۰ میکرولیتر به لام‌ها اضافه شد. لام‌ها سپس در محفظه مرطوب به مدت ۲ ساعت در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن لام‌ها دو مرتبه و هر بار به مدت ۵دقیقه توسط محلول PBS شست و شو داده شدند. سپس محلول آنتی کور دوم (FITC) رقیق شده با محلول PBS+Regiler (۱درصد) به صورت ۷ میکرولیتر آنتی‌کور دوم+۹۹۳ میکرولیتر محلول PBS+Regiler، برای ۱۰ لام، هر لام ۱۰۰ میکرولیتر به لام‌ها اضافه شد. لام‌ها سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محفظه مرطوب نگهداری شدند. در نهایت پس از شست‌وشوی لام‌ها در محلول PBS دو مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط چسب مخصوص (Gel Mount Aqueous) مونتاژ شدند و توسط میکروسکوپ نوری فلورسنت با طول موج ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر مورد مطالعه و عکسبرداری قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در یک سری از لام‌ها که به عنوان لام‌های شاهد منفی انتخاب شدند به جای آنتی‌کور اول محلول ۱۰ برابر رقیق شده PBS+Regiler اضافه شد.

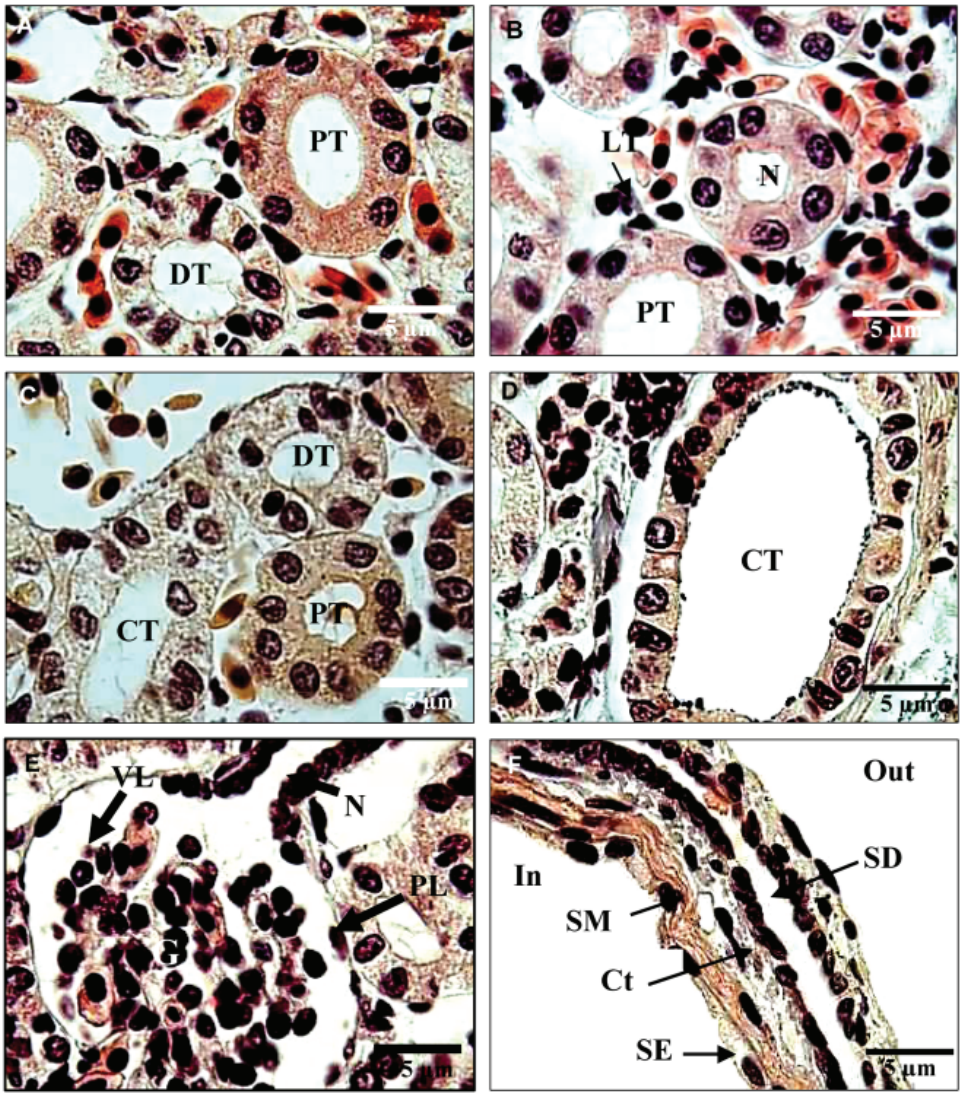
شدت فلورسنت در بخش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار Optimas version 6.51 image analysis softwar (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) محاسبه و به صورت عدم، ضعیف و شدید مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها

بافت شناسی

در بچه تاس‌ماهیان ایرانی سازگار به آب شیرین، بخش رأسی کلیه از بافت لنفوئیدی و بافت خون‌ساز تشکیل شده است.

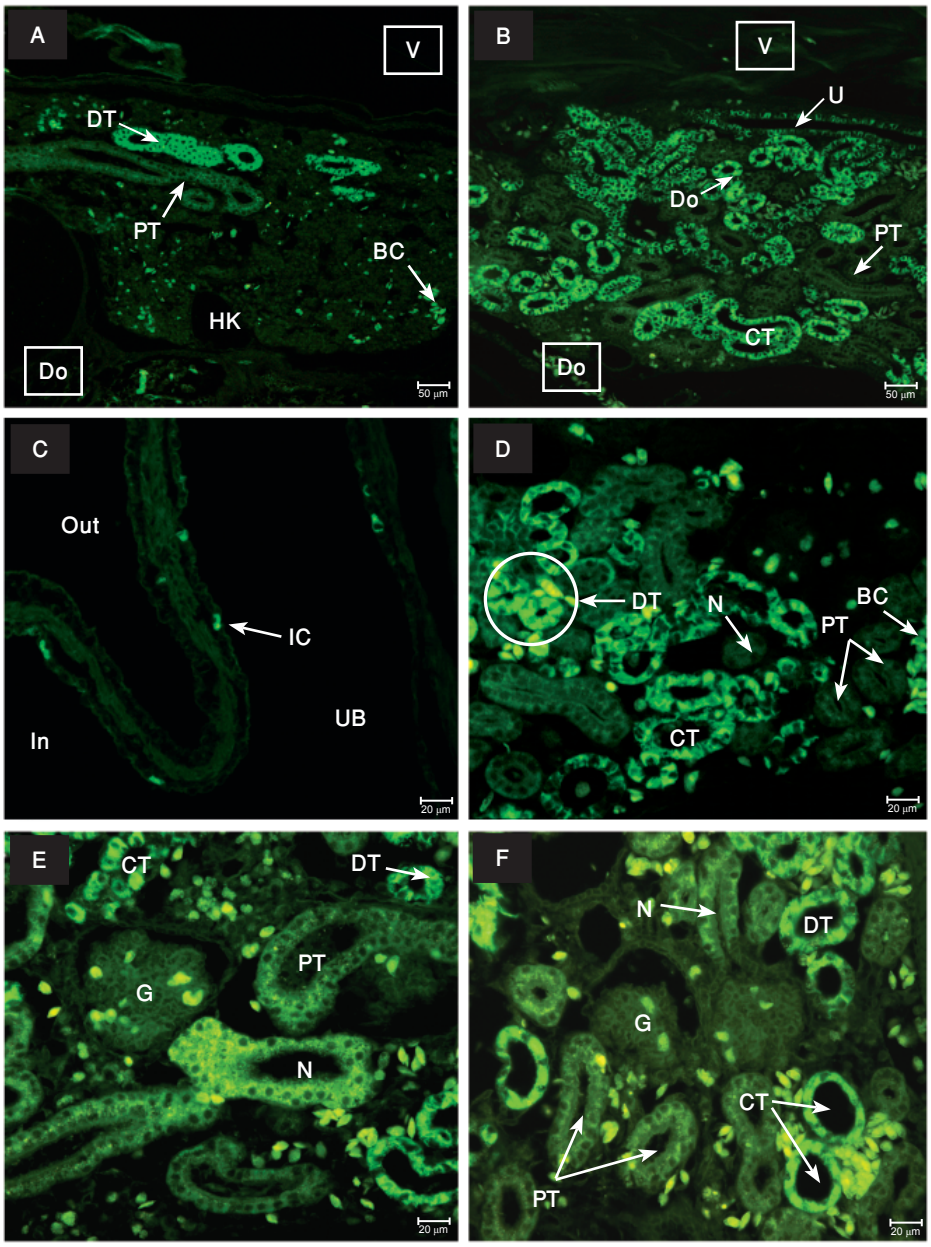
در این بخش توبول‌های پروکسیمال پرونفروزی و توبول‌های دیستال پرونفروزی دیده شد ولی ساختار گلومرول مشاهده نشد. نفرون‌های کلیوی در بخش مزونفروز دارای جسم مالپیگی (گلومرول و کپسول بومن) (شکل ۱E)، قطعه گردنی (شکل ۱B)، توبول پروکسیمال، توبول دیستال (شکل ۱A)، توبول جمع‌کننده ادرار (شکل ۱C) بود که هر نفرون از طریق توبول‌های جمع‌کننده ادرار با قطر بیشتر (شکل ۱D) نهایتا به میزنای (شکل ۱F) و سپس به مثانه اتصال می‌یافتند. سلول‌های توبول پروکسیمال دارای میکرویلی در ناحیه رأسی (حاشیه مسواکی) بوده و وزیکول‌های اگزوسیتوزی در آنها قابل ملاحظه بود (شکل ۱A).



شکل ۱: برش عرضی از توبول‌های کلیوی و بخش‌های مختلف کلیه در بچه تاس‌ماهیان ایرانی سازگار شده با آب شیرین (رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-فوشین).
A: توبول پروکسیمال با سلول‌های استوانه‌ای و هسته‌های قاعده‌ای حاشیه‌های مسواکی واقع در بخش رأسی این سلول‌ها واضح است. توبول‌های دیستال با سلول‌های مکعبی، فاقد حاشیه مسواکی و دارای هسته‌های مرکزی
B: قطعه گردنی دارای لومن باریک و سلول‌های استوانه‌ای نسبتا بلند که در بخش رأسی این سلول‌ها حاشیه مسواکی کوتاهی دیده می‌شود
C: توبول‌های جمع کننده اولیه با سلول‌های مکعبی، فاقد حاشیه مسواکی و دارای هسته‌های قاعده‌ای
D: توبول جمع کننده ثانویه با سلول‌های مکعبی کوتاه، هسته‌های بیضوی تا گرد درشت قاعده‌ای و فاقد حاشیه مسواکی
E: لایه خارجی کپسول بومن دارای سلول‌های سنگفرشی ساده با هسته‌های دوکی یا کشیده و لایه داخلی دارای سلول‌های مکعبی کوتاه و هسته‌های کروی درشت
F: سه لایه در میزنای دیده شد: لایه داخلی از نوع بافت پوششی مسطح، لایه میانی از نوع بافت پیوندی و ماهیچه‌های صاف و لایه خارجی نیز از نوع بافت پیوندی
CT: توبول جمع‌کننده (Collective Tubule)؛ Ct: بافت پیوندی (Connective Tissue)؛ DT: توبول دیستال (Distal Tubule)؛ LT: بافت لنفوئیدی (Lymphoid Tissue)؛ N: قطعه گردنی (Neck)؛ PT: توبول پروکسیمال (Proximal Tubule)؛ PL: لایه پاریتال (Parietal Layer)؛ SD: مجرای جنسی (Sexual Duct)؛ SM: ماهیچه صاف (Smooth Muscle)؛ SE: اپی تلیال سنگفرشی (Squamous Epithelial)؛ VL: لایه ویسرال (Visceral Layer).

مکان یابی سلول های غنی از میتوکندری در بافت کلیه بچه ماهیان تاس ماهی ایرانی سازگار با آب شیرین (شاهد)

مطالعات ایمونوهیستوشیمی روی نمونه‌های انتخاب شده نشان داد که در بچه ماهیان ایرانی سازگار شده با آب شیرین، سلول‌های غنی از میتوکندری در توبول‌های دیستال، توبول‌های جمع کننده، میزنای و کیسه ادراری وجود دارد (شکل ۲A–D). شدیدترین میزان ایمونوفلورسانس در توبول‌های دیستال به ویژه بخش ابتدایی آن دیده شد (شکل ۲D). در گلومرول، قطعه گردنی و توبول پروکسیمال شدت منفی بوده و در واقع ایمونوفلورسانس مشاهده نشد (شکل ۲D). سلول‌های خونی به طور کلی اتوفلورسنت زرد رنگی را از خود نشان می‌دهند (شکل ۲D).



شکل ۲: مکان‌یابی سلول‌های غنی از میتوکندری با استفاده از مکان‌یابی آنزیم **Na^+, K^+-ATPase** در برش طولی و عرضی بافت کلیه بچه ماهیان سازگار شده با آب شیرین (**A-D**) و بچه ماهیان مواجه شده با آب رقیق شده دریای خزر ۵ گرم در لیتر (**E, F**)
A: برش طولی از بخش رأسی بافت کلیه که توبول‌های پروکسیمال و دیستال پرونفروزی دیده می‌شوند. **B**: برش طولی از بخش تنه‌ای کلیه. در میزنای سلول‌های غنی از میتوکندری دیده می‌شود. **C**: برش عرضی از کیسه ادراری که سلول‌های غنی از میتوکندری در اپی‌تلیوم داخلی به صورت جداگانه با فاصله زیاد بر روی آن مشخص هستند. **D**: برش عرضی بخش تنه‌ای کلیه و توبول‌های کلیوی. گلومرول‌ها فاقد ایمونوفلورسانس هستند. **E**: سلول‌های غنی از میتوکندری توبول‌های پروکسیمال به ویژه در قسمت ابتدایی (قطعه گردنی) دارای ایمونوفلورسانس ضعیفی هستند. **F**: سلول‌های غنی از میتوکندری توبول‌های جمع کننده ادراری دارای ایمونوفلورسانس قابل توجهی هستند.
BC: سلول خونی (**Blood Cell**)؛ **CT**: توبول جمع کننده (**Collective Tubule**)؛ **Do**: بخش پشتی (**Dorsal**)؛ **DT**: توبول دیستال (**Distal Tubule**)، **G**: گلومرول (**Glomerulus**)؛ **HK**: بخش راسی کلیه (**Head Kidney**)؛ **IC**: سلول یونوسیت (**Ionocyte Cell**)؛ **N**: نوتوکورد (**Notochord**)؛ **PT**: توبول پروکسیمال (**Proximal Tubule**)؛ **U**: میزنای (**Ureter**)؛ **UB**: کیسه ادراری (**Urinary Bladder**)؛ **V**: بخش شکمی (**Ventral**).

در بخش رأسی کلیه (بافت هماتوپویتیک و لنفوئیدی) نیز ایمونوفلورسانسی دیده نشد (شکل ۲A). توبول‌های دیستال پرونفروزی بخش رأسی و توبول‌های دیستال مزونفروزی بخش تنه‌ای و دمی دارای شدت ایمونوفلورسانس مشابه بودند. در توبول‌های پروکسیمال پرونفروزی نیز مانند توبول‌های مزونفروزی ایمونوفلورسانسی مشاهده نشد (شکل ۲A). در توبول‌های دیستال، ایمونوفلورسانس در سلول‌ها به صورت یکنواخت دیده نشد. به طوری که در برخی از سلول‌های یک توبول دیستال، ایمونوفلورسانس قویی دیده شد و کل سیتوپلاسم دارای ایمونوفلورسانس بود. در حالی که در سایر سلول‌های همان توبول ایمونوفلورسانس ضعیف‌تری به چشم می‌خورد. به عبارت دیگر بین سلول‌ها از لحاظ داشتن میزان ایمونوفلورسانس اختلاف وجود داشت. با وجود این در هر دو گروه سلول میزان ایمونوفلورسانس، بیشتر در بخش‌های قاعده‌ای-جانبی سلول‌ها دیده شد (شکل D و ۲B).

در توبول‌های جمع‌کننده نیز بین سلول‌ها از لحاظ داشتن میزان ایمونوفلورسانس اختلاف وجود داشت ولی این اختلاف زیاد قابل توجه نبود. در سلول‌های این توبول نیز میزان ایمونوفلورسانس، بیشتر در بخش‌های قاعده‌ای-جانبی سلول‌ها دیده شد. در میزنای سلول‌ها با فواصل کوتاه از هم در بخش قاعده‌ای-جانبی دارای ایمونوفلورسانس بودند که فاصله بین سلول‌های ایمونوفلورسانس به تدریج تا کیسه ادراری بیشتر می‌شد (شکل ۲B). در کیسه ادراری تعداد کمی سلول ایمونوفلورسانس با فواصل زیاد مشاهده گردید که شدت ایمونوفلورسانس نیز در آنها چندان قابل توجه نبود (شکل ۲C).

مکان‌یابی سلول‌های غنی از میتوکندری در بافت کلیه بچه ماهیان مواجه شده با آب رقیق شده دریای خزر (۵ گرم در لیتر)

مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان داد که در بچه ماهیان ۳-۲ گرمی تاس‌ماهی ایرانی سازگار شده با آب ۵ گرم در لیتر مانند نمونه های آب شیرین سلول‌های غنی از میتوکندری در توبول‌های دیستال، توبول‌های جمع کننده، میزنای و کیسه ادراری وجود دارد (شکل ۲E). در توبول پروکسیمال، به ویژه قطعه گردنی، ایمونوفلورسانس بسیار ضعیفی دیده شد (شکل F و ۲E). در گلومرول نیز ایمونوفلورسانسی مشاهده نشد (شکل ۲F).

بحث

در آب شیرین، اولین و اصلی‌ترین فعالیت اندام کلیه دفع آب اضافه از بدن و در عین حال بازجذب یون‌های فیلتر شده است (۱۳). توبول‌های دیستال و جمع‌کننده در ماهیان یوری هالین استخوانی، محل بازجذب فعال یون‌های Na^+ و Cl^- هستند که فرایند جذب این دو یون به فعالیت آنزیم Na^+, K^+-ATPase وابسته است (۱۴). در ماهیان استخوانی آب شیرین، نزدیک به ۹۵ درصد از یون‌های Na^+ و Cl^- فیلتر شده در بخش دیستال و جمع کننده توبول‌های کلیوی، بازجذب می‌شود که نتیجه آن تولید ادرار رقیق است (۱۵). توبول‌های دیستال و جمع‌کننده در ماهیان تلئوست یوری هالین سازگار شده با آب شیرین دارای ویژگی مشترکی هستند که این ویژگی توانایی بالای این توبول‌ها در بازجذب یون‌ها و تولید ادرار رقیق است (۱۶). در آب شیرین به دلیل کم بودن یون‌های موجود در آب و دفع مقادیر بالایی آب، لازم است سلول‌های غنی از میتوکندری موجود در توبول‌های کلیوی به ویژه توبول‌های دیستال و جمع‌کننده با افزایش میزان بازجذب یونی از مایع فیلترا و دفع آب اضافی بدن تعادل یون و آب را در بدن حفظ کند (۱۷). ایمونوفلورسانس شدید در سلول‌های غنی از میتوکندری توبول‌های دیستال و جمع‌کننده در ماهیان یوری هالین سازگار به آب شیرین نشان دهنده فعالیت بالای این توبول‌ها در بازجذب یون از مایع فیلترا است (۱۸). میزان بالای ایمونوفلورسانس در توبول‌های دیستال و جمع‌کننده بچه تاس‌ماهیان سازگار شده با آب شیرین (شاهد) می‌تواند نشان دهنده فعالیت بالای آنزیم Na^+, K^+-ATPase برای بازجذب یون‌های موجود در مایع فیلترا باشد. علت تفاوت در نحوه پراکنش ایمونوفلورسانس در بین سلول‌های اپی‌تلیال، می‌تواند به دلیل تفاوت سلول‌ها از لحاظ میزان چین‌خوردگی‌های غشای قاعده‌ای-جانبی، میزان عمق چین‌خوردگی‌ها (۶) و میزان حضور آنزیم Na^+, K^+-ATPase باشد.

علی‌رغم اینکه توبول‌های پرونفروز در اغلب مهره‌داران همگام با رشد و تشکیل توبول‌های مزونفروز تخریب شده و از میان می‌رود (۱۹)، این توبول‌ها در بخش رأسی کلیه بچه ماهیان (۴-۳/۵ ماهه) دیده شد. وجود ایمونوفلورسانس شدید در توبول‌های دیستال پرونفروزی این بچه ماهیان بیانگر شرکت فعال این توبول‌ها در فرایند تنظیم اسمزی است.

مارشال با مطالعات فیزیولوژیک بر روی کیسه ادراری چند گونه از ماهیان استخوانی سازگار شده با آب شیرین نشان داده است در این ماهیان کیسه ادراری نقش مهمی در بازجذب یون‌های Na^+ و Cl^- دارد (۱۴). علاوه بر این لاهلو و همکارانش (۲۰) در وزغ ماهی (*Opsanus tau*)، رنفرو و همکارانش (۲۱) در فلاندر زمستانی (*Pseudopleuronectes americanus*) و وود (۲۲) در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) سازگار شده با آب شیرین نیز به همین نتیجه دست یافته‌اند. در حالی که در مطالعه حاضر واکنش ایمنیایی ضعیف و یا عدم آن در کیسه ادراری می‌تواند دلیل عدم دخالت این بخش در بازجذب یون‌های تک‌ظرفیتی باشد، لذا این بخش در بچه تاس‌ماهی ایرانی تنها در ذخیره و نگهداری ادرار تولیدی نقش دارد.

در تیمار شاهد (آب شیرین)، بخش‌های گلومرول، قطعه گردنی و توبول‌های پروکسیمال، دارای سلول‌های ایمونوفلورسانس به آنزیم Na^+, K^+-ATPase نبودند و نشانگر عدم دخالت آنها در باز جذب یونی است و وجود وزیکول‌های اگزوسیتوزی در سلول‌های پروکسیمال، مبین دخالت آنها در ترشح برخی از مواد دفعی مانده در خون است.

بینباچ و همکارانش نشان داده‌اند در کیلی‌فیش (*Fundulus heteroclitus*) سازگار شده با آب شیرین ۱۰درصد لوله پروکسیمال کلیوی یون‌های سدیم وکلراید را ترشح می‌کند (۲۳)، این در حالی است که در همین ماهی که با آب شور سازگار شده این مقدار بین ۳۰ الی ۷۰ درصد افزایش می‌یابد. توبول پروکسیمال محل اصلی ترشح یون‌های دو ظرفیتی در آب شور است (۱، ۱۳). طبق نظریه ناتوچین و گوسو (۵) یکی دیگر از راه‌های ترشح یون های دوظرفیتی در توبول پروکسیمال علاوه بر نظریه هنتچن و زیرولد (۱۶) مبنی بر اگزوسیتوز وزیکول‌های حاوی یون‌های دو ظرفیتی آنزیم‌های هم‌انتقال دهنده Na^+/Mg^{+2}, Na^+/Ca^{+2} است که این

هم‌انتقال دهنده‌ها در بخش رأسی سلول‌های اپی‌تلیال پروکسیمال قرار دارند و نیروی مورد نیاز برای این هم‌انتقال دهنده‌های یونی از طریق آنزیم H^+-ATPase موجود در بخش رأسی و بیشتر توسط آنزیم Na^+, K^+-ATPase که در بخش قاعده‌ای-جانبی سلول‌های اپی‌تلیال پروکسیمال قرار دارند، تامین می‌شود. گامباریان (۶) در مطالعه خود بر روی توبول‌های پروکسیمال ۵ گونه از ماهیان خاویاری دریای خزر در مرحله بلوغ از جمله تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده کرد در توبول‌های پروکسیمال (به ویژه بخش های ابتدایی آن) ماهیان سازگار شده با آب شیرین سلول های تمایز نیافته‌ای وجود دارند که روی آنها را سلول‌های شفاف (Light Cell) نامید. این سلول‌ها نسبتا پهن هستند و در هنگام مواجه شدن این ماهیان با آب شور دریای خزر این سلول‌های تمایز نیافته دچار تغییراتی در بخش قاعده‌ای-جانبی (افزایش چین خورگی‌های قاعده‌ای-جانبی) می‌شوند. علاوه بر این، تعداد میتوکندری در آنها افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر، با توجه به غلظت یون‌های دو ظرفیتی موجود در آب خزر نسبت به آب شیرین به نظر می‌رسد پس از انتقال ماهیان به آب ۵ گرم در لیتر در توبول‌های پروکسیمال، میزان چین‌خوردگی‌های غشاء قاعده‌ای-جانبی و میزان آنزیم Na^+, K^+-ATPase برای افزایش ترشح یون‌های دو ظرفیتی افزایش یافته است که این مطلب می‌تواند دلیل مناسبی برای ایمونوفلورسانس ضعیف مشاهده شده در قطعه گردنی و توبول پروکسیمال باشد.

نتیجه گیری

سلول‌های غنی از میتوکندری موجود در توبول‌های کلیوی تاس‌ماهی ایرانی قابل مکان‌یابی با روش ایمونوهیستوشیمی آنزیم Na^+, K^+-ATPase هستند. با توجه به تغییرات ایجاد شده در نحوه پراکنش آنزیم Na^+, K^+-ATPase در سلول‌های اپی‌تلیالی توبول‌های کلیوی بچه ماهیان تیمار ۵ گرم در لیتر نسبت به نمونه های شاهد، می‌توان به این نتیجه رسید که علی‌رغم اینکه در این شوری اسمولالیته خون و مایعات بدن با آب محیط حالت نزدیک به ایزوتونیک دارد ولی هنوز لازم است برخی از یون‌ها از بدن دفع و یا بازجذب شوند. به نظر می‌رسد بچه ماهیان در این وزن با داشتن سلول‌های غنی از میتوکندری مجهز به آنزیم Na^+, K^+-ATPase در توبول‌های کلیوی توان نقل و انتقالات یونی را دارند و قادر به مواجه شدن با شوری محیط رهاسازی شده هستند.

References

1. Varsamos S, Nebel C, Charmantier G. Ontogeny of osmoregulation in post-embryonic fish. Com Biochem Physiol. 2005; 141: 401-429.
2. Jurd RD. Instant Notes in Animal Biology. Bios Sci Pub. 2000; 140-145.
3. Flik G, Varsamos S, Guerreiro PMG, Fenwich X. Drinking in (very young) fish. In: Hosen N, Flik G (eds). Osmoregulation and drinking in vertebrates. SEB Symposium Series. Bios Sci Publishers Ltd: Oxford: Bios Sci Pulishers Ltd; 2002; 54: 31-47.
4. Hickman CP, Trump BF. The kidney. In: Hoar WS, Randall DJ (eds). Fish physiology. New York: Academic Press; 1969; 1: 91-239.
5. Natochin YuV, Gusev GP. The coupling of magnesium secretion and sodium reabsorption in the kidney of teleost. Comp Biochem Physiol. 1970; 37: 107-111.
6. Gambaryan SP. Kidney morphology in sturgeon: a microdissectional and ultrastructure study. J Fish Biol. 1988; 33: 383-398.
7. Lin CH, Tsai RS, Lee TH. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis* in response to salinity challenge. J Comp Biochem Physiol. 2004; 138: 287-295.
8. Hirose S, Kaneko T, Natio N, Takei Y. Molecular biology of major components of chloride cells.Com Biochem Physiol. 2003; 136: 593-620.
9. Lignot JH, Nugroho Susanto G, 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 Tiss Res. 2001; 319: 331-339.
10. Imsland S, Bronzie P, Bryialsen A. Gill Na^+, K^+-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scaphthalmus maximus*) reared at different temperature and salinities.Aquacul. 2003; 218: 671-683.
11. Khodabandeh S, Charmantier G. Charmantier-Daures. Immunolocalization of Na^+, K^+-ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and post-embryonic development of the Lobster, *Homarus gammarus*. J Crastacean Biol. 2006; 26(4): 515-523.
12. Khodabandeh S, Taghizadeh Z. Immunolocalization of Na^+, K^+-ATPase and ionocytes in gill of catfish, *Silurus glanis*. Yakhteh. 2007; 8(1): 45-52.
13. Beyenbach KW. Kidney sans glomeruli. Am J Physiol. 2003; 286: 811-827.
14. Marshall WS. Transport processes in isolated teleost epithelia: opercular epithelium and urinary bladder. In: Wood CM, Shuttleworth JT (eds) Fish physiology. San Diago: Academic Press. 1995; 14: 1-23.
15. Beyenbach KW, Baustian MD. Comparative Physiology of the Proximal Tubule: In Structure and Function of the Kidney. J physiol. 2003; 53: 48-71.
16. Hentschel H, Zierold K. Morphology and element distribution of magnesium-secreting epithelium: the proximal tubule segment PII of dogfish, *Scyliorhinus caniculus* (L.). Eur J Cell Biol. 1994; 63: 32-42.
17. Nishimura H, Fan Z. Regulation of Water Movement across Vertebrate Renal Tubules. Comp Biochem Physiol. 2003; 136: 479-798.
18. Perry SF, Shahsavarani A, Georgalis T, Bayaa M, Furimsky M, Thomas SLY. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid–base regulation. J Exp Zool. 2003; 300: 53-62.
19. Reimschuessel R. A Fish Model of Renal Regeneration and Development. ILAR J. 2001; 42 (4): 258-291.
20. Lahlou B, Henderson IW, Sawyer WH. Renal adaptations by *Opsanus tau*, a euryhaline aglomeru-

lar teleost to dilute media. Am J Physiol. 1969; 216: 1266-1272.
21. Renfro JL. Water and ion transport by the urinary bladder of the teleost *Pseudopleuronectes americanus*. Am J Phisiol. 1975; 228: 52-61.
22. Curtis BJ, Wood CM. The function of urinary bladder in vivo in the freshwater rainbow trout. J Exp Biol. 1991; 155: 567-583.
23. Beyenbach KW, Baustian MD. Comparative Physiology of the Proximal Tubule: In Structure and Function of the Kidney. J Physiol. 1989; 53: 48-71.