فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی 25، جلد 7، شماره 2، بهار 93، صفحه 39 تا 48

روند ظهور یونوسیت‌های آبشش و پوست در مراحل اولیه رشد و نمو لارو سوف سفید دریای خزر(*Sander lucioperca*)

محدثه احمدنژاد[1]، شهربانو عریان[2]، محمود بهمنی[3]، محمد صیاد بورانی[1]
1- پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی ایران، بندرانزلی. ایران. **m_ahmadnezhad@yahoo.com**
2-دانشکده زیست شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران. ایران.
3- موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت. ایران.
تاریخ دریافت: 93/12/26 تاریخ پذیرش:93/2/27

چکیده

مقدمه و هدف: ماهی سوف سفید(*Sander lucioperca*) از ماهیان مهم واقتصادی دریای خزر می‌باشد که به دلیل کاهش ذخایر آن در سال‌های اخیر، تکثیر نیمه مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان آن برای احیای نسل به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر انجام می-گیرد. مطالعه درمورد تنظیم اسمزی ماهی و چگونگی شکل‌گیری ساختارهای دخیل در آن از جمله تکوین یونوسیت‌های آبشش و پوست برای تصحیح فرآیند رهاسازی به محیط‌های آب شیرین و یا شور ضروری است.

روش کار: رشد و نمو عملکرد تنظیم اسمزی آبشش و توزیع و تراکم سلول‌های یونوسیت پوست لاروهای ماهی سوف سفید دریای خزر از روز اول تا روز یازده پس از تفریخ با استفاده از مطالعه بافت‌شناسی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین و ایمونوهیستوشیمی به-وسیله‌ی مکان‌یابی آنزیم Na^+, K^+-ATPase، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: رشد و نمو فیلامنت‌ها از روز چهارم پس از تفریخ آغاز شد، درحالی‌که سلول‌های یونوسیت واجد ایمونوفلورسانس در آن‌ها مشاهده نگردید. ایمونوفلورسانس ضعیفی از جانب سلول‌های یونوسیت واقع بر فیلامنت‌ها در روز هشتم مشاهده شد. نخستین جوانه-های لاملا در روز یازدهم با ایمونوفلورسانس بسیار ضعیف، ظاهر شدند. عمده پراکنش یونوسیت‌های پوست تا روز 8 پس از تفریخ در ناحیه غشای کیسه زرده بود و پس از آن تا روز یازدهم به سمت ناحیه شکمی انتهای بدن گرایش پیدا نمود. تعداد و سطح اشغال شده توسط یونوسیت‌ها در پوست از روز اول تا 11 روز بعد از تفریخ افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: در لارو سوف سفید دریای خزر رشد و نمو کامل عملکرد تنظیم اسمزی آبشش تا سن یازده روزگی انجام نشده و تنظیم اسمزی تا این سن عمدتاً برعهده یونوسیت‌های پوست است.

واژه‌های کلیدی: تنظیم اسمزی، دریای خزر، سوف سفید، Na+, K+-ATPase.

مقدمه

تنظیم اسمزی مکانیسمی است که هموستازی مایعات درون بدن را حفظ می‌کند و مسئول کنترل اسمولاریته یا فشار اسمزی پلاسما می‌باشد(10). در ماهی‌های بالغی که جزو تنظیم کنندگان اسمزی محسوب می‌شوند، توازن آب و مواد معدنی عمدتاً بر عهده‌ی آبشش‌ها، دستگاه گوارش، کلیه، پوست و تحت کنترل سیستم نورواندوکرین می‌باشد. آبشش مکان اصلی فرآیندهای نقل و انتقال یون و آب درمحیط آبی است، زیرا بزرگ-ترین سطح نفوذپذیر را در ماهی دارد و به دلیل داشتن اپی‌تلیوم ویژه و ارتباط مستقیم با محیط پیرامون، مهم-ترین اندامی است که تنظیم اسمزی در آن صورت می-پذیرد(21). در مراحل اولیه رشد و نمو ماهیان که اندام-های ویژه تنظیم فشار اسمزی و از جمله آبشش‌ها جهت انجام تبادلات املاح هنوز به میزان لازم و کافی به تکامل نرسیده‌اند، پوست در کنار سایر وظایف فیزیولوژیک خود یعنی حفاظت، تنفس و ترشح (دفع)، وظیفه کمک به تنظیم فشار اسمزی را نیز برعهده دارد و این وظیفه را با استفاده از سلول‌های کلراید موجود در اپیدرم خود انجام می‌دهد. ساختار سلولی و مکانیزم عملکرد فیزیولوژیک سلول‌های کلراید پوست(یونوسیت‌ها) مشابه ساختار و عملکرد سلول‌های کلراید آبشش می‌باشد(33). این

سلول‌ها حاوی مقادیر فراوانی از آنزیم Na^+- K^+ ATPase (NKA) می‌باشند. این آنزیم در تمام سلول‌های بدن وجود داشته، اما میزان حضور آن در سلول‌های کلراید آبشش و پوست به‌ویژه در غشای قاعده‌ای-جانبی بسیار زیاد است و نقشی حیاتی در تبادل یون‌ها و تنظیم اسمزی ایفا می‌کند(35). اهمیت پوست در فرآیند دفع یون کلر برای اولین بار توسط Shelbourne (1957) در بدن لارو کفشک ماهی(*Pleuronectes platessa*) گزارش شد(28). Lasker و Threadgold نیز در سال 1968، حضور یونوسیت‌ها در پوست لارو ماهی ساردین(*Sardinops caerulea*) را برای نخستین بار گزارش نمودند(19). از آن به بعد مطالعه درمورد حضور سلول-های کلراید غیرآبششی یا همان یونوسیت‌های پوستی در مراحل لاروی و توزیع و تراکم آن‌ها در نقاط مختلف پوست بدن لارو در تعداد زیادی از ماهیان استخوانی از جمله ماهی آنچوی (24)، ماهی ayu(*Plecoglossus altivelis*)، فلاندر دریایی(*Kareius bicoloratu*)، کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)(9)، شگ ماهی (*C*) (34)، تیلاپیای موزامبیک(*Oreochromis mossambicus*) (1،30)، کفشک ماهی (*Parealichthys olivaceus*) (7)، قزل‌آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*) (26)، باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)(31)، در سیم دریایی بزرگ سر(*Sparus aurata*)(3)، ماهی آزاد دریای خزر(*Salmo trutta caspius*)(5) گزارش شده است. در بیشتر این مطالعات پوست به عنوان جایگاه اصلی تنظیم اسمزی در مراحل اولیه رشد و نمو ماهی عنوان شده و پراکنش یونوسیت‌ها عمدتاً بر روی تنه، کیسه زرده، سر و باله‌ها ذکر گردیده است (33، 4)، اما تنوع در مکان حضور، تراکم و پراکنش سلول‌های مذکور در بدن لاروهای گونه‌های مختلف نشان داده است که تراکم و توزیع یونوسیت‌ها می‌تواند بین گونه-های مختلف ماهی‌ها متفاوت باشد. از سوی دیگر، توانایی تنظیم یونی و اسمزی به میزان تکوین آنتوژنیک اندام‌های درگیر در این فرآیند به‌خصوص آبشش، نیز بستگی دارد(33). درخصوص رشد و نمو سلول کلراید آبششی در مار ماهی ژاپنی(*Anguilla japonica*)(27) فلاندر ژاپنی(*Paralichthys olivaceus*)(7)، ماهی Killi fish(*Fundulus heteroclitus*)(12) مطالعاتی صورت گرفته است. هم‌چنین مکان‌یابی آنزیم NKA در آبشش مراحل لاروی سیم دریایی بزرگ سر(*S. aurata*) با هدف یافتن زمان شروع عملکرد آبشش به منظور تنظیم اسمزی توسط Bodinier و همکاران (2010) انجام شده است. مکان‌یابی آنزیم NKA به‌وسیله آنتی بادی‌ها در مطالعات ایمونوهیستوشیمی به عنوان شاخصی برای شناسایی سلول‌های کلراید (یونوسیت‌ها) به کار می-رود(8،11،15،20،22). ماهی سوف سفید (*S.lucioperca*) از ماهیان مهم واقتصادی دریای خزر می‌باشد که به دلیل کاهش ذخایر آن در سال‌های اخیر، تکثیر نیمه مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان آن برای احیای نسل به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر انجام می‌گیرد. مطالعه درمورد تنظیم اسمزی و چگونگی شکل‌گیری ساختارهای دخیل در آن ماهی از جمله مطالعاتی است که برای تصحیح فرآیند رهاسازی به محیط‌های آب شیرین و یا شور ضروری است. وجود ابهامات فراوان درمورد روند تکامل ساختاری آبشش و پوست و نقش تنظیم اسمزی آن‌ها در مراحل اولیه رشد و نمو سوف سفید سبب شد تا تحقیق حاضر درمورد نقش تنظیم اسمزی سلول‌های یونوسیت (کلراید) پوست در مرحله لاروی و شناسایی و مکان‌یابی سلول‌های کلراید در پوست و آبشش و نقش فیزیولوژیک آن‌ها در تنظیم اسمزی این گونه انجام گیرد. هدف از این مطالعه مکان-یابی آنزیم NKA و تعیین موقعیت و میزان حضور سلول-های کلراید در پوست و آبشش در مراحل اولیه لاروی (از روز 1 تا روز11 پس از تفریخ) به منظور یافتن ارتباط

بین بزرگ‌تر شدن لارو با تعداد و اندازه سلول‌های یونوسیت پوست و زمان ظهور فیلامنت، لاملا و عملکرد فیزیولوژیک آن‌ها در تنظیم اسمزی بوده است.

مواد و روش‌ها

200 عدد لارو تازه از تخم خارج شده حاصل از تکثیر نیمه مصنوعی یک جفت مولد سوف سفید متعلق به نیمه جنوبی دریای خزر در بهار سال 1390 از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی دکتر یوسف‌پور سیاهکل تهیه و به ایستگاه تحقیقاتی تخصصی تغذیه و غذای زنده آبزیان (ساحل غازیان) وابسته به پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی کشور (بندر انزلی) منتقل گردیدند. لاروها تحت شرایط کنترل شده در وان حاوی آب چاه جریان دار تصفیه و هوادهی شده نگه‌داری شدند. دما، اکسیژن و pH آب در طی مدت آزمایش ثبت می‌گردید. از لاروهای متعلق به روزهای اول، چهارم، هشتم و یازدهم پس از تفریخ، نمونه برداری شد(14). در هر دفعه نمونه‌برداری به‌طور تصادفی تعداد 6 لارو صید و برای عملیات بافت‌شناسی در بوئن تثبیت گردید. پس از 24 ساعت نمونه‌ها از محلول بوئن خارج و در الکل 70٪ شستشو و نگه‌داری شدند. سپس نمونه‌ها از مراحل آبگیری با درجات مختلف الکل، شفاف سازی، پارافینه شدن، قالب‌گیری، برش، رنگ‌آمیزی (هماتوکسیلین و ائوزین) و مونته کردن عبور داده شدند(2). برش از ابتدا تا انتهای بدن هر لارو با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری و با ضخامت 4 میکرون صورت گرفت. مطالعات تکامل ساختاری در آبشش و شمارش سلول‌های یونوسیت پوست با استفاده از لام‌های بافت‌شناسی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و میکروسکوپ نوری انجام گرفت (14،15). برای مکان-یابی ایمن‌یابی آنزیم NKA(نشان‌گر سلول‌های کلراید یا یونوسیت) و شناسایی سلول‌های یونوسیت، از آنتی-بادی $IgG\alpha_5$ استفاده شد. برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، برش‌ها بر روی لام‌های پلی –ال لیزین قرار گرفتند سپس توسط گزیلن پارافین‌زدایی شده و در سری افزایشی الکل آب‌گیری شدند. آن‌گاه به ترتیب 10 دقیقه در محلولS1 (محلول 3 قرصPBS (Phosphate Buffer Saline) در 1500سی‌سی آب مقطر باpH= 7/3)، 10 دقیقه در محلولS2 (250 سی سی از محلول S1 + 2/18 گرمNaCl + 40 میکرولیترTween 20 با pH= 7/3، 20 دقیقه در محلولS3 (150 سی سی از محلولS1 و 750 میلی گرم Regiler) قرار داده شدند. سپس لام‌ها به مدت 1 دقیقه در محلول S1 آب کشیده شده و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب طوری قرار داده شدند که برش‌ها به طرف بالا باشد. روی هر لام 100 میکرولیتر از آنتی بادی $IgG\alpha5$ رقیق شده در محلول S4 (500 میکرولیتر $IgG\alpha5$ + 500 میکرولیتر محلول S4 (2 سی سی S3 + 8 سی‌سی آب)) اضافه گردید و به مدت 2 ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شدند. سپس لام‌ها به مدت 2 دقیقه در محلول S1 آب‌کشی شده و 3-2 قطره آنتی بادی FITC (985 میکرولیتر محلول S4 +15میکرولیتر آنتی‌بادی دوم) روی هر لام اضافه شده و یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه‌داری شدند. سپس لام‌ها 2 بار در محلول S1 به مدت 2 دقیقه آب-کشی شده و با استفاده از مایع مونتاژ، مونتاژ شدند. جهت پی بردن به درستی کارکرد این آنتی‌بادی، به تعدادی از لام‌ها آنتی‌بادی اول اضافه نشد درحالی‌که آنتی‌بادی دوم اضافه گردید(لام‌های ایمونوهیستوشیمی شاهد) بنابراین این لام‌ها نباید فلورسانسی نشان بدهند. کلیه لام‌ها بعد از قرار دادن لامل روی آن‌ها در جعبه‌های مخصوص چیده شده و برای حفظ خواص فلورسانسی در جای تاریک نگه‌داری شدند. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس Nikon (TE,2000S) با فیلترهای 450–490 nm مشاهده و از آن‌ها عکس‌برداری به عمل آمد(14، 16، 17، 18). شمارش سلول‌های یونوسیت پوست در

یک میلی‌متر مربع از سطح پوست در 18 برش عرضی از ابتدا، وسط و انتهای بدن هر لارو انجام و در صد سطح اشغالی توسط سلول‌های یونوسیت پوست محاسبه و مساحت حداقل 100 سلول در هر لارو اندازه‌گیری شد. تمام اندازه‌گیری‌ها با استفاده از نسخه دوم نرم افزار Image Tool انجام شد (29، 16). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده ازنسخه 13 نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد سنجش قرار گرفت. در مورد داده‌های نرمال برای مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس و تست دانکن و برای داده‌های غیر نرمال از آزمون ناپارامتریک Kruskal-Wallis و تست Mann-Whitney U استفاده شد. نمودارها با نرم افزار Excell رسم شدند.

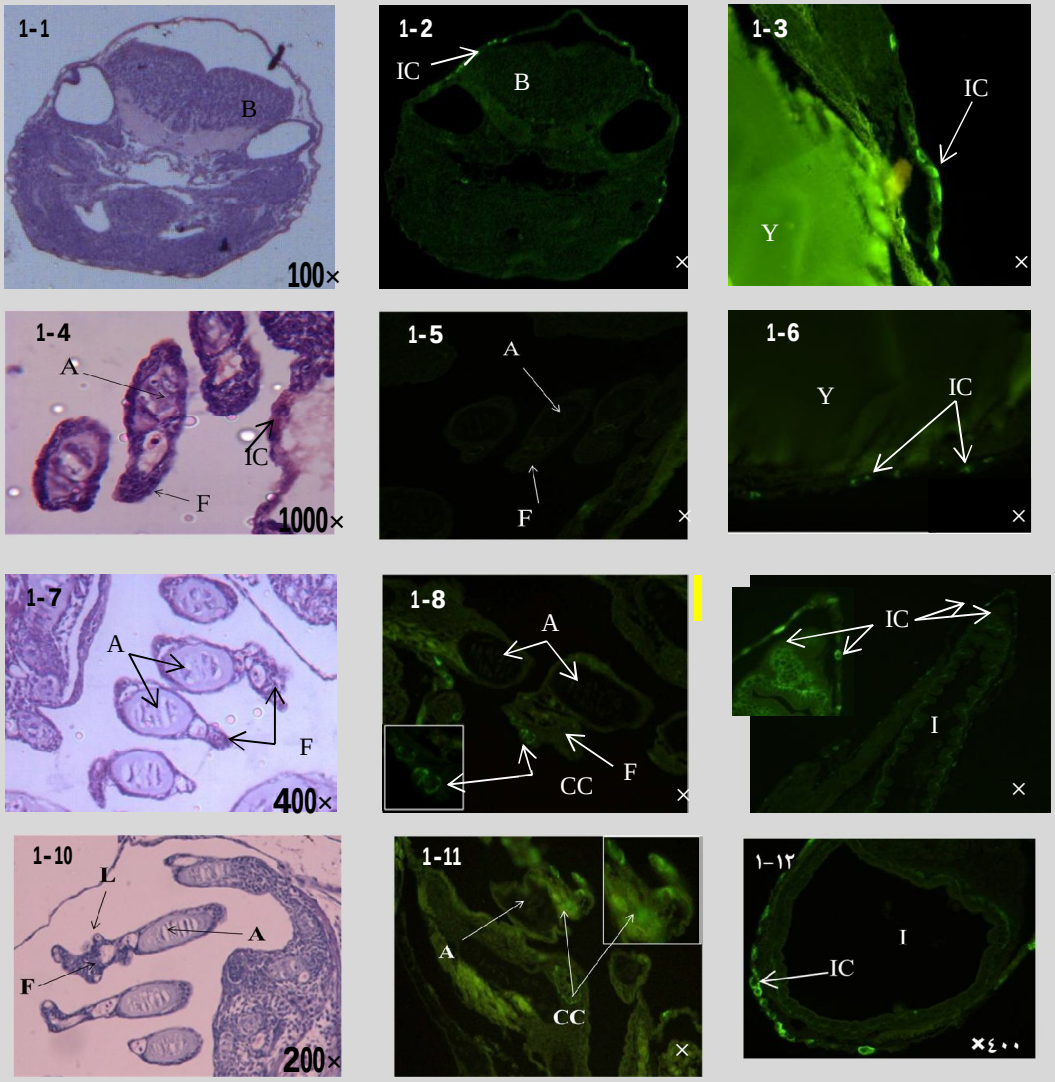
نتایج

هیستومورفولوژی آبشش و ایمونولوکالیزاسیون یونوسیت‌ها در پوست و آبشش‌ها طی مراحل لاروی

در بررسی ساختار و مراحل رشد و نمو آبشش در لاروهای یک روزه، فیلامنت مشاهده نشد(شکل1-1). در روز چهارم پس از تفریخ، حفره آبششی همراه با 4 جفت کمان آبششی و فیلامنت‌های در حال نمو پدیدار گشت در حالی‌که سلول‌های کلراید واجد ایمونوفلورسانس(IF) در آن‌ها مشاهده نگردید(شکل5-1). سلول‌های کلراید IF روی فیلامنت‌ها در لاروهای هشت روزه ظاهر شدند(شکل8-1). نخستین جوانه‌های لاملا و تعداد اندکی سلول‌های کلراید IF روی فیلامنت‌ها در لاروهای یازده روزه دیده شد(شکل10-1 و 11-1). بافت شناسی و مکان یابی آنزیم NKA جهت تعیین توزیع سلول‌های یونوسیت ایمونوفلورسانس پوست در نقاط مختلف بدن لاروها نشان داد که در لارو یک روزه یونوسیت پوست در مناطق مختلف بدن از جمله رأس سر به خصوص نواحی نزدیک چشم(شکل2-1) هم‌چنین پوست ناحیه جوانه باله، غشاء دور تا دور کیسه زرده هم‌چنین درپشت بدن از ابتدا تا انتهای بدن پراکنده شده‌اند. بیشترین تراکم سلول یونوسیت و شدت ایمونوفلورسانس در غشای کیسه زرده به‌خصوص در ناحیه میانی بدن وجود داشت(شکل3-1). پراکنش یونوسیت‌های پوست در بدن لارو 4 روزه شبیه به لارو یک روزه بود. چند یونوسیت نیز در اپی‌تلیوم حفره دهان و سرپوش آبششی مشاهده شد که واکنش ایمنی با آنتی‌بادی اول برقرار نکرده و درنتیجه فاقد رنگ ایمونوفلورسانس بودند(شکل4-1). شدت ایمونوفلورسانس در یونوسیت‌های پوست ناحیه سر و غشای کیسه زرده در ناحیه میانی بدن بیشتر از سایر نقاط بود(شکل6-1). در لارو 8 و یازده روزه که کیسه زرده جذب شده بود یونوسیت‌های IF پوست در تمام نقاط بدن پراکنده شده بودند و بیشترین تراکم یونوسیت و شدت ایمونوفلورسانس در ناحیه میانی و انتهایی بدن وجود داشت(شکل9-1). وضعیت در لاروهای یازده روزه شبیه 8 روزه‌ها بود. به‌علاوه، تراکم یونوسیت و شدت رنگ ایمونوفلورسانس در ناحیه اپی‌تلیوم حفره دهان نسبت به 8 روزه‌ها بیشتر بود، هم‌چنین بیشترین تراکم و شدت IF به ناحیه شکمی و انتهای بدن اختصاص داشت(شکل12-1).

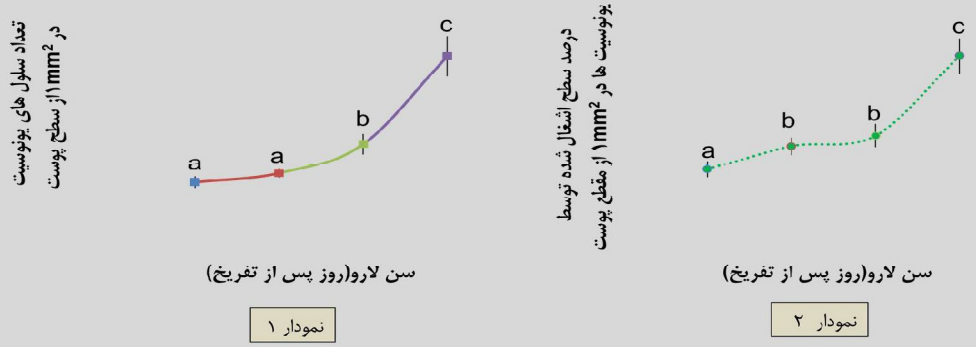
نتایج شمارش و اندازه‌گیری سلول‌های یونوسیت پوست

با بزرگ‌تر شدن لاروها تعداد سلول‌های یونوسیت در یک میلی‌متر مربع از سطح پوست افزایش یافت به‌طوری‌که در روزهای 8 و 11 پس از تفریخ به‌طور معنی‌داری بالاتر از روزهای 1 و 4 پس از تفریخ قرار داشت($p<0/05$)(نمودار1). درصد سطح اشغال شده توسط یونوسیت‌ها در 1 میلی‌متر مربع از مقطع پوست در روز 4 به‌طور معنی‌داری بالاتر از روز 1 بود($p<0/05$) و تا روز 8 به آهستگی افزایش یافت($p\geq0/05$) و سرانجام در روز 11 به‌طور معنی‌داری در بیشترین مقدار قرار گرفت ($p<0/05$)(نمودار2).



شکل1- تصاویربافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی آنزیم Na^+,K^+-ATPase از لارو سوف سفید دریای خزر طی دوره رشد و نمو پس از تفریخ. (1-1) و (1-2): مقطع عرضی سر لارو یک روزه که فاقد شکاف‌های آبششی است و هیچ سلول یونوسیت واجد ایمونوفلورسانسی(IF) در محدوده دهانی و آبشش مشاهده نمی‌شود و چندین یونوسیت IF در پوست سر نزدیک حدقه مشخص‌اند (1-2). (1-3): یونوسیت‌های IF در پوست غشای کیسه زرده از مقطع عرضی بدن لارو یک روزه. (1-4) و (1-5): مقطع عرضی از سر لارو 4 روزه که در آن کمان‌های غضروفی آبششی و فیلامنت‌های درحال رشد مشخص‌اند، چند سلول یونوسیت در اپی‌تلیوم حفره آبششی در رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین ائوزین مشاهده شد(1-4) که با روش ایمونوهیستوشیمی این سلول‌ها ایمونوفلورسانسی نشان ندادند. (1-6): یونوسیت‌های IF در پوست غشای کیسه زرده از مقطع عرضی بدن لارو چهار روزه. (1-7) و (1-8): مقطع عرضی (1-7) و طولی (1-8) سر لارو هشت روزه که چند سلول یونوسیت(کلراید) واجد ایمونوفلورسانس روی فیلامنت در حال نمو مشخص است. (1-9): مقطع طولی لارو 8 روزه و تصویری با بزرگنمایی 400 × ناحیه انتهایی که یونوسیت های IF پوست نواحی پشتی و شکمی در انتهای بدن در آن مشخص است. (1-10) و(1-11): مقطع عرضی (1-10) و طولی (1-11) منطقه سر لارو یازده روزه که با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین رشد و نمو جوانه‌های لاملا کاملاً معین است و تصویر ایمونوهیستوشیمی وجود سلول‌های یونوسیت ایمونوفلورسانس را روی فیلامنت در حال نمو نشان می‌دهد. (1-12): تراکم فراوان یونوسیت‌های IF در پوست ناحیه شکمی انتهای بدن مقطع عرضی بدن لارو 11 روزه.

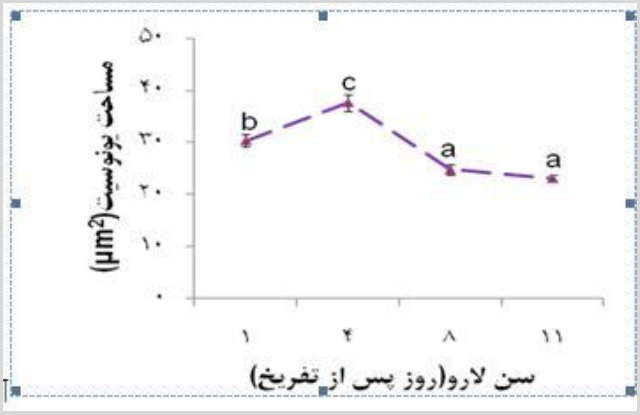
علائم اختصاری: A : کمان آبششی، B: مغز، CC: سلول کلراید آبششی، F : فیلامنت، I : روده، IC: سلول یونوسیت پوست، L: لاملا.



نمودار1 - مقایسه میانگین تعداد سلول‌های یونوسیت در $1mm^2$ از سطح پوست. نمودار2درصد سطح اشغال شده توسط یونوسیت‌ها در $1mm^2$ از مقطع پوست لاروهای سوف سفید در روزهای اول، چهارم، هشتم و یازدهم پس از تفریخ در آب شیرین.

حروف غیریکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ($p<0/05$).

میانگین مساحت سلول‌های یونوسیت پوست (میکرومتر مربع)در روز 4 به‌طور معنی‌داری بالارفت($p<0/05$) و نسبت به سایر روزها در بیشترین مقدار قرار گرفت و سپس تا روز 11 کاهش معنی‌داری یافت ($p<0/05$)(نمودار3



نمودار3- نمودارمقایسه میانگین مساحت (μm^2) سلول‌های یونوسیت پوست لاروهای سوف سفید *S. lucioperca* در روزهای اول، چهارم، هشتم و یازدهم پس از تفریخ در آب شیرین.

حروف غیریکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ($p<0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی آنتوژنی سلول‌های یونوسیت (کلراید) تنظیم کننده یونی در بافت آبشش و پوست لارو سوف سفید دریای خزر از طریق مکان یابی ایمن‌یابی NKA و مطالعه بافت‌شناسی، در لاروهای یک روزه سوف سفید، فیلامنت آبششی و سلول یونوسیت آبششی واجد ایمونوفلورسانس(IF) مشاهده نشد، اما در همین زمان سلول‌های یونوسیت واجد IF قوی درپوست سر به‌ویژه نواحی مجاور حدقه چشم، پشت بدن، جوانه باله‌ها و به تعداد متراکم و با شدت رنگ قوی‌تر در غشای کیسه زرده در ابتدا و به‌خصوص در ناحیه میانی بدن مشاهده گردید. عدم مشاهده فیلامنت‌ها در لاروهای یک روزه سوف سفید دلالت بر عدم رشد و نمو آن‌ها در دوران جنینی این ماهی دارد. بنابراین در سوف سفید مانند سیم

دریایی(*S. aurata*)(3) و باس دریایی(*D. labrax*)(32)، رشد و نمو آبشش پس از دوران جنینی و در مراحل لاروی انجام می‌شود، اما در مطالعه روی برخی از ماهیان استخوانی نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص شد که شروع رشد و نمو آبشش در دوره جنینی صورت می-گیرد (6). در تحقیق حاضر، در لاروهای 4 روزه، 4جفت کمان آبششی و فیلامنت‌های در حال نمو مشاهده گردید که نشان می‌دهد تشکیل شکاف‌های آبششی، سپس تمایز حفره آبششی و به‌دنبال آن رشد ونمو کمان‌ها و رشته-های آبششی پس از روز اول لاروی یعنی روز دوم تا چهارم پس از تفریخ اتفاق افتاده است. در تحقیق انجام شده روی ماهی وال آی(*Stizostedion vitreum*)، نشان داده شد که فیلامنت‌های آبشش در روز 3 پس از تفریخ ظاهر شدند(25). علاوه بر این در مطالعه ایمونوهیستوشیمی از لاروهای 4 روزه سوف سفید سلول‌های کلراید واجد IF در آبشش در حال نمو تشخیص داده نشد، در حالی‌که در پوست سر نزدیک حدقه چشم، باله‌ها و به تعداد بسیار اندک در اپی‌تلیوم حفره دهان و سرپوش آبششی سلول‌های یونوسیت واجد IF با شدت متوسط مشاهده گردید و بیشترین تراکم سلول یونوسیت و شدت IF در غشای کیسه زرده به‌ویژه در نواحی میانی بدن وجود داشت. یعنی وقتی که ساختار آبششی در سوف سفید شروع به تمایزو رشد و نمو نمود سلول‌های یونوسیت پوست هنوز عمده‌ترین مکان نقل و انتقال یونی در بدن لارو بودند. در مطالعه بر روی سیم دریایی همزمان با تمایز حفره آبششی و رشد و نمو کمان‌های آبششی در روز دوم پس از تفریخ سلول‌های کلراید ایمونوفلورسانس در قسمت سقف حفره آبششی نمایان شدند و حضور و تراکم سلول‌های کلراید ایمونوپوزتیو سرانجام در روز 30 پس از هچ مشاهده و ثبت گردید(3). در بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر اولین نشانه‌های واکنش ایمن‌یایی در سلول‌های کلراید فیلامنت که نشان‌گر آغاز روند برعهده گرفتن عملکرد تنظیم اسمزی در آبشش سوف سفید می‌باشد، در لاروهای 8 روزه مشاهده شد. در باس دریایی(*D. labrax*) وجود تعداد کمی سلول کلراید IF روی فیلامنت در حال نمو در لارو 6 روزه گزارش شده است(23). در لارو 11 روزه سوف سفید نخستین جوانه-های لاملا و تعداد اندکی سلول‌های کلراید IF روی فیلامنت‌ها مشاهده گردید. نتیجه به‌دست آمده درباره ماهی وال آی نشان داد که رشد و نمو لاملا بعد از شروع تغذیه فعال(10 روز پس از تفریخ) رخ داد(25). Katoh و همکاران (2000) در لارو ماهی Killi fish گزارش نمودند که سلول‌های کلراید در زمان تفریخ ایمونوفلورسانس ضعیف داشتند و بیان داشتند که این سلول‌ها احتمالاً نابالغ‌اند ولی به وظایف خود در نقل و انتقال یون‌ها عمل می‌کنند. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که در 4 روزگی لاملا ظاهر شد و سلول‌های کلراید فیلامنت به خوبی توسعه یافته و با آنتی‌بادی ضد NKA به شدت واکنش ایمنی برقرار نمودند و از این شواهد نتیجه گرفتند که در Killi fish این مرحله نقطه آغاز هردو عملکرد آبشش به عنوان اندام تنفسی و تنظیم‌کننده اسمزی می باشد(12). در مورد ماهی مورد مطالعه در تحقیق حاضر هرچند ظهور لاملا در روز 11 پس از تفریخ اتفاق افتاد اما تعداد سلول‌های کلراید فیلامنتی و شدت ایمونوفلورسانس آن‌ها کم بود، بنابراین آشکار شدن سلول‌های کلراید فیلامنتی هرچند با ایمونوفلورسانس کم قدرت نشانه‌ای از آغاز رشد و نمو عملکرد تنظیم اسمزی آبشش است اما تا روز 11 پس از تفریخ رشد و نمو نقش عملکردی تنظیم اسمزی آبشش کامل نشده است و به تدریج و با افزایش سن کامل می‌شود. هم‌زمان با ظهور سلول‌های کلراید ایمونوفلورسانس در فیلامنت‌های در حال رشد و نمو لاروهای 8 تا 11 روزه و نیز آغاز رو به رشد روند عملکردی تنظیم اسمزی در این لاروها،

سلول‌های یونوسیت پوست IF در لارو 8 روزه هم‌چنان در پوست سر نزدیک حدقه چشم وجود داشت و به دلیل جذب شدن کیسه زرده، تراکم آن‌ها در پوست ناحیه پشت و شکم گسترش یافت. هم‌چنین تراکم و شدت ایمونوفلورسانس در نواحی میانی و انتهایی بدن بیشتر از ناحیه ابتدایی بدن لاروها متمرکز شده بود. در لاروهای 11 روزه که در آن‌ها هنوز رشد و نمو آبشش کامل نشده است هم بیشترین تراکم یونوسیت و شدت IF به سمت ناحیه شکمی و نیز انتهای بدن تمایل داشت ضمن آن‌که این تراکم و شدت در ناحیه اپی‌تلیوم حفره دهان نسبت به 8 روزه‌ها بیشتر بود. بنابراین در لارو سوف سفید تا روز 11 پس از تفریخ تقریباً پوست تمام نقاط بدن کم و بیش واجد یونوسیت‌های بالغی بودند که عملکرد تنظیم اسمزی داشتند. بدین ترتیب مکان عمده حضور یونوسیت‌های فعال در مرحله قبل از جذب کیسه زرده، غشای کیسه زرده به‌ویژه در ناحیه میانی بدن و در مرحله پس از جذب کیسه زرده پوست نواحی شکم و انتهای بدن بود. مناطق ذکر شده در تحقیق حاضر در مورد حضور یونوسیت‌های پوست از جمله نقاط عمده‌ای است که با تراکم‌های متفاوت در مطالعات سایر محققین درگونه‌های مختلف ماهی‌ها مشاهده شده است(33). Varsamosو همکاران (2005) در یک مقاله مروری در مورد آنتوژنی تنظیم اسمزی در ماهیان، با بررسی تحقیقات انجام شده روی لارو گونه‌های مختلفی هم-چون تیلاپیای موزامبیک(*O. Mossambicus*)، ماهی ayu یوری هالین، فلاندر دریایی استنوهالین ، کپور معمولی آب شیرین، شگ ماهی و باس دریایی که از نظر توزیع یونوسیت‌ها و تراکم آن‌ها در پوست‌شان اختلاف داشتند، بیان نمودند که اختلاف در توزیع و تراکم سلول‌های یونوسیت پوست به گونه وابسته است. آن‌ها هم‌چنین بیان داشتند که معلوم نیست که تفاوت در توزیع و تراکم سلول‌های مذکور در پوست لارو گونه‌های مختلف اهمیت اکولوژیک و فیزیولوژیک برخوردار باشد ولی پیشنهاد شده است که، این پارامترها رابطه نزدیکی با ملزومات مختلف فرآیند تنظیم اسمزی در بدن آن‌ها دارد(33). نتایج شمارش و اندازه‌گیری درمطالعه حاضر نشان داد که تعداد و سطح اشغال شده توسط یونوسیت‌های پوست تا 11 روزگی افزایش داشته است و اندازه یونوسیت‌ها تا 4روزگی افزایش داشته و پس از آن تا روز 11 بعد از تفریخ که کیسه زرده نیز کاملاً جذب شده بود، کاهش داشته است. درقزل آلای رنگین کمان گزارش شده است که بیشترین تراکم کل یونوسیت‌های پوست تا نیمه‌های مرحله جذب کیسه زرده بود و پس از آن کاهش صورت گرفت(26). در سیم دریایی نشان داده شد که اندازه یونوسیت‌ها از زمان تفریخ تا لارو حدود 6 میلی‌متری افزایش و پس از آن تا مرحله جوانی کاهش یافت و تراکم یونوسیت‌ها و درصد سطح اشغال شده توسط آن‌ها در پوست از زمان تفریخ تا مرحله جوانی کم شد(32). در مطالعه روی ماهی آزاد دریای خزر مشاهده شدکه در روز اول پس از تفریخ رشد و نمو یونوسیت‌های آبشش کامل نشد و عمده تراکم یونوسیت‌ها روی غشای کیسه زرده بود، هم‌چنین این نتیجه به‌دست آمد که با افزایش سن تا روز 9 پس از تفریخ و با افزایش تراکم و تکمیل رشد و نمو سلول‌های کلراید آبششی، یونوسیت‌های پوست ناحیه تنه و کیسه زرده کاهش یافتند(5). در فلاندر ژاپنی اندازه و تراکم یونوسیت‌های پوست از زمان تفریخ تا مرحله لاروی بعد از متامورفوز کاهش نشان داد و پوست بدن در روز 28 عاری از یونوسیت‌ها شد جز یونوسیت‌های کوچکی که روی باله‌ها باقی مانده بودند(7). بدیهی است که درمشاهدات حاصل از مطالعه روی برخی از گونه‌های یاد شده، بسته به تفاوت موجود در گونه و نیز روزها و سنین در نظر گرفته شده برای مطالعات آنتوژنیک در هر مطالعه، نتایج کم و بیش متفاوتی گزارش شده است. اما

از مقایسه نتایج این مطالعات و مطالعه بر روی لارو سوف سفید می‌توان دریافت که به دلیل کامل نشدن رشد و نمو عملکرد تنظیم اسمزی در سلول‌های کلراید آبششی در لارو یازده روزه سوف سفید دریای خزر، نقش عملکردی تنظیم اسمزی در لاروهای مذکور تا روز 11 پس از تفریخ غالباً برعهده یونوسیت‌های پوست می‌باشد. به‌طور کلی از نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر چنین بر می‌آید که هرچند رشد و نمو عملکردی تنظیم اسمزی در آبشش لاروهای ماهی سوف سفید دریای خزر تا سن یازده روزگی کامل نشد اما در سلول‌های یونوسیت پوست رشد و نمو و قابلیت تنظیم اسمزی با افزایش سن لارو افزایش یافت به‌طوری‌که تا زمان تشکیل لاملا و بالغ شدن سلول‌های کلراید آبششی، نقش اصلی تنظیم اسمزی برعهده یونوسیت‌های پوست بود.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی (بندرانزلی) سرکار خانم دکتر فلاحی، ریاست محترم ایستگاه تحقیقاتی تخصصی تغذیه و غذای زنده آبزیان ساحل غازیان جناب آقای مهندس دقیق روحی و کارکنان گرامی‌شان، ریاست و کارکنان محترم مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی دکتر یوسف پور سیاهکل هم‌چنین از جناب آقای دکتر خدابنده و سایر عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Ayson, F. G., Kaneko, T., Hasegawa, S., Hirano, T. (1994). Development of mitochondrian rich cells in the yolk sac membrane of embryos and larvae of Tilapia (*Oreocheomis mossambicus*) in fresh water and sea water. Journal of Experimental Zoology, 270; 129-135.

2. Bancroft, J. D. and Stevens, A. (1977). Theory and Practice of Histological Techniques. Edinburgh London and New York: Churchill Livingstone. P.1-94

3. Bodinier, C., Sucré, E., Lecurieux-Belfond, L., Blondeau-Bidet, E., Charmantier, G. (2010). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Comparative Biochemistry and Physiology, 157(A); 220–228.

4. Evans, D.H. (1980). Kinetic studies of ion transport by fish gill epithelium. American Journal of Physiology, 238; R224–R230.

5. Ghanizadeh Kazerouni, E., Khodabandeh, S. (2011). Ionocyte immunolocalization and the effects of ultraviolet radiation on their abundance and distribution in the alenins of Caspian Sea salmon, *Salmo trutta caspius*. Cell Journal (Yakhteh), 13(1); 45-54.

6. Gonzalez, M.E., Blanquez, M.J., Rojo, C. (1996). Early gill development in the Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Morphology, 229; 201–217.

7. Hiroi, J., Kaneko, T., Seikai, T., Tanaka, M. (1998). Developmental sequence of chloride cells in the body skin and gills of Japanese Flounder *Paralichthyys olivaceus* larvae. Zoological Science, 15; 455-460.

8. Hirose, S., Kaneko,T., Naito. Takei, y. (2003). Molecular biology of major components of choride cells. Comparative Biochemistry and Physiology, 136; 593-620.

9. Hwang,P. P., Sun, C. M., Woo, S. M. (1989). Changes of plasma osmolarity, chloride concentration and gill Na^+- K^+-ATPase activity in tilapia *Oreochamos mossambiocus* during seawater acclimation. Marin Biology, 100; 295-233.

10. Jurd, R. D. (2000). Instant notes in animal biology. Biological Science Publications, P.140-145

11. Kaneko, T. and J. Hiroi. (2008). Osmo and ionoregulation. In: Finn, R.N and Kapoor, B.G. Fish Larval Physiology. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 163-183.

12. Katoh, F., Shimizu, A., Uchida, K., Kaneko, T. (2000). Shift of chloride cell distribution during early life stages in seawater-adapted killifish (*Fundulus heteroclitus*). Zoological Science, 17; 11 –18.

13. Khodabandeh, S. (2005). In the gut the zygoptera *Ischnura elegans*, and anisoptera, libellula *Lydia larce* (odonata) activity and immunocytochemical localization. Zoological Studies, 45; 53-63.

14. 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 Research, 319; 153-165.

15. Khodabandeh, S., Charmantier, G., Chramantier-daures, M. (2006). Immunolocalization of Na^+,K^+-ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and post–embryonic development of the lobster, *Homarus gammarus*. Journal of Crustacean Biology, 26(4); 515-523.

16. Khodabandeh, S., Shahriari, M., Abtahi, B. (2009a). Changes in chloride cells abundance Na^+, K^+-ATPase immunolocalization and activity in gills of golden grey mullet, *liza aurata* fry during adaptation to different salinities. Yakhteh Medical Journal, 11; 49-54.

17. Khodabandeh, S., Khoshnood, Z., Mosafer, S. (2009b). Immunolocalization of mitochondrial rich cells in the gill urinary system of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* fry. Aquaculture Research, 40; 329 – 336.

18. Khodabandeh, S., Mosafer , S., Khoshnood, Z. (2009c). Effect of cortisol and salinity acclimation on Na^+,K^+,2Cl cotransporter gene expression and Na^+, K^+-ATPase activity in gill of Persian sturgeon *Acipenser persicus* fry. Science Marina; 111-116.

19. Lasker, R., Threadgold, L.T. (1968). Chloride cells in the skin of the larval sardine. Experimental Cell Research, 52; 582– 590.

20. Lignot, J. H., Nugroho susanto, G., Charmantier- daures, M., Charamantier, G. (2001). Immunolocalization of Na^+, K^+-ATPase in the branchial cavity during the early development of cray fish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). Cell and Tissue Research, 319; 331-339.

21. Lin, Y. M., Chen, C. N., Lee, T. H. (2003). The expression of gill Na^+, K^+-ATPase in milkfish *Chanos chanos* acclimated to seawater brackish water and freshwater. Comparative Biochemistry and Physiology, 135; 489-497.

22. Nebel, C., Romestand, B., Nègre-Sadargues, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Bacal, J., Bonhomme, F. and Charmantier, G. (2005b). Differential freshwater adaptation in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*: involvement of gills and urinary system. Journal of Experimental Biology, 208, 3859-3871.

23. Nebel, C., Boulo, V., Bodinier, C., Charmantier, G. (2006). The $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter in the sea bass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: involvement in osmoregulation. The Journal of Experimental Biology, 209; 4908-4922.

24. O'connell, C. P. (1981). Development of organ systems in the northern anchovy *Engraulis mordax* and other teleosts. American Zoology, 21; 429-446.

25. Phillips, T.A., Summerfelt, R.C. (1999). Gill development of larval walleyes. American Fish Society, 128; 162– 168.

26. Rambourgh, P. J. (1999). The gill of fish larvae. Is it primilary a respiratory or an ionoregulatory. Journal of Fish Biology, 55(A); 186–204.

27. Sasai, S., Katoh, F., Kaneko, T. and Tsukamoto, K. (2007). Ontogenic change of gill chloride cells in leptocephalus and glass eel stages of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Marine Biology, 150; 487–496.

28. Shelbourne, J.E. (1957). Site of chloride regulation in marine fish larvae. Nature, 180; 920–922.

29. Shikano, T., Fujio, Y. (1999). Changes in salinity tolerance and branchial chloride cells of newborn guppy during freshwater and seawater adaptation. Journal of Experimental Zoology, 284; 137–146.

30. Van der Heijden, A.J.H., Van der Meij, J.C.A., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E. (1999). Ultra structure and distribution dynamics of chloride cells in tilapia larvae in fresh water and sea water. Cell Tissue Research, 297; 119–130.

31. Varsamos, S. (2001). L'osmore´gulation chez le loup *Dicentrarchus labrax*: adaptation aux variations de salinite´ et ontogene`se des me´canismes osmore´gulateurs. The`se de doctorat. Universite´ Montpellier II, vol. 1 and 2.

32. Varsamos, S., Diaz, J.P., Charmantier, G., Blasco, C., Connes, R., Flik, G. (2002). Location and morphology of chloride cells during the postembryonic development of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Anatomy and Embryology, 205; 203–213.

33. Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G. (2005). Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. Comparative Biochemistry and Physiology, 141(A); 401–429.

34. Wales, B., Tytler, P. (1996). Changes in chloride cell distribution during early larval stages of Clupea harengus. Journal of Fish Biology, 49; 801– 814.

35. Wendelaar Bonga, S. E. (1997).The stress response in fish. Physiological Review, 77; 591- 625.