مطالعه تاثیر شوری‌های مختلف محیطی بر سلول های کلراید آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به روش ایمونوهیستوشیمی و فراساختاری

زهرا بصیر*[۱]، رحیم پیغان[۲]

*z.basir@scu.ac.ir

۱- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲-گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی به مدت دو هفته در تیمار با شوری‌های ppt ۴، ppt ۸، ppt ۱۲ و آب شیرین با سه تکرار قرار داده شدند. در پایان دوره جهت مطالعات هیستومورفولوژی نمونه‌هایی از آبشش با ضخامت۴ µ تا ۶ µ تهیه شد. همچنین برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی و فراساختاری نمونه‌های مورد نظر برداشت گردید. نتایج حاکی از آن بود که در موضع فیلامنتی بیشترین تعداد سلول‌های کلراید مربوط به شوری ppt ۸ و کمترین تعداد در تیمار شاهد، بزرگترین اندازه در شوری ppt ۱۲ و کوچکترین متعلق به شوری ppt ۴ گزارش گردید. در موضع لاملایی بیشترین تعداد سلول‌های کلراید در شوری ppt ۴ و کمترین در تیمار شاهد بدون تغییر در اندازه مشاهده شد. در مطالعات ایمونوهیستوشیمی سلول‌های کلراید به تعداد زیاد در اپیتلیوم فیلامنتی و به تعداد کمتر در اپیتلیوم لاملایی در شوری‌های مختلف در قسمت رأسی، پایه و بین لاملاها روی فیلامنت بین لاملایی حضور داشتند. بر اساس مطالعات فراساختاری غشاء رأسی سلول‌های کلراید شامل فرورفتگی‌های عمیق، کم عمق و برآمده بود. به طور کلی، قدرت تحمل و سازش پذیری کپور معمولی نسبت به تغییرات شوری محیط، بدلیل ایجاد تغییرات سریع در سلول‌های کلراید جهت تنظیم میزان ورود و خروج آب و الکترولیت‌ها بالا بود بطوریکه گونه مورد نظر توانست نسبت به تغییرات شوری‌های محیطی خود را تطبیق و ادامه حیات دهد.

کلمات کلیدی: شوری، آبشش، کپور معمولی، ایمونوهیستوشیمی، فراساختاری

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

مقدمه

کپور معمولی از خانواده کپور ماهیان دارای ۲ جفت سبیلک، فلس هایی درشت و باله پشتی ممتد می‌باشد (باصری ارغوانی و همکاران، ۱۳۹۸). این گونه در حوضه‌های دریای خزر، رودخانه تجن و تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد و دارای حداکثر طول ۱۵۰ و میانگین ۳۸ سانتی‌متر می‌باشد (اینانلو و همکاران، ۱۳۹۸). ماهیان استخوانی، ماهیان بدون آرواره، سارکوپتریژین‌ها و ماهیان غضروفی دارای ۱۰-۸ عدد کمان آبششی و در هر کمان نیز تعداد فراوانی رشته آبششی وجود دارد که توسط هزاران تیغه آبششی اولیه حمایت می‌شوند. این رشته های آبششی برای مبادله گازها بکار رفته و بافت پوششی آن برای انتقال یون‌ها اختصاص یافته است (Yang *et al*., 2013). آبشش‌ها تقریبا در تمام ماهیان، محل اصلی تبادل گازها بوده و از کمان‌های استخوانی یا غضروفی تشکیل شده و رشته‌های آبششی به آنها اتصال دارند. همچنین تعداد زیادی تیغه‌های ریز به صورت برآمدگی‌هایی در دو طرف رشته‌ها قرار گرفته و محل‌های اصلی تبادل گاز بشمار می‌آیند. این تیغه‌ها از سلول های پوششی نازک در خارج و غشاهای پایه نازک به همراه سلول‌های پیلار پشتیبان در داخل تشکیل شده‌اند (Duncan *et al*., 2011). ماهیان با افزایش تیغه‌ها و نزدیکتر کردن فاصله و افزایش طول آنها، ناحیه سطحی آبشش ها را افزایش می‌دهند. سلول‌ها برای زنده ماندن و تنظیم اسمزی در ماهیان به یک محیط با غلظت‌های خاص از مواد معین از جمله یون‌های محلول در آب و جابجایی بین محیط‌های آب شیرین و شور نیاز دارند. بنابراین، محیط داخلی بدن ماهیان باید دارای مجموعه‌ای از نمک‌های یونیزه مورد نیاز و ترکیبات آلی محلول در آب باشد (Cruz *et al*., 2013). جمیلی (۱۳۷۰) میزان تحمل نسبی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) را در مقابل تغییرات شوری سنجید. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Kazemi و همکاران (۲۰۰۳) بر تکامل سلول‌های کلراید در ماهیان خاویاری انجام گرفت، مشاهده گردید که عملکرد سلول‌ها طی مراحل مختلف رشد ماهی تکامل می‌یابد . همچنین کاهش شدید تعداد سلول‌های کلراید در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در شوری‌های۲۰pptو ۳۰ ppt توسط قاضی لو و همکاران (۱۳۸۷) بررسی شد. ماهیان استخوانی آب شیرین و همچنین ماهیان غضروفی که نسبت به محیط خود هیپراسمتیک هستند، محیط داخلی آنها غلیظ‌تر از آب شیرین بود. بنابراین، آب به طور دائم از طریق انتشار به درون بدن آنها نفوذ می‌کند. آب اضافی دائماً توسط کلیه‌های تکامل یافته به صورت مقادیر زیادی ادرار رقیق دفع می‌شود. از سوی دیگر، بعضی از یون‌های کوچک به طور اجتناب ناپذیری از راه ادرار و همچنین از طریق انتشار از آبشش‌ها تلف می‌شوند (Gonzalez *et al*., 2010). اگر چه تعدادی از این مواد محلول مجدداً توسط مواد موجود در غذا جایگزین می‌شوند، اما بیشتر آنها از طریق آبشش‌ها و توسط مکانیسم‌های انتقال فعال باز جذب می‌شوند. از جمله این سلول‌ها سلول‌های کلراید می باشند که آنها را سلول‌های یونی یا سلول‌های غنی از میتوکندری نیز می‌نامند که در انتقال یون‌ها دخالت دارند (Hiroi and McCormick, 2012). تنظیم اسمزی در ماهیان استخوانی با دخالت مستقیم سلول‌های کلراید و از طریق یکسری عملکردهای کاملاً متمایز در ماهیان ساکن آبهای شیرین به انجام می‌رسد. این ماهیان با مشکل همیشگی دفع آب اضافی بدن و جذب دوباره‌ی یون‌های ضروری از دست رفته مواجه خواهند بود. دفع آب اضافی از طریق تولید ادرار رقیق و جذب یون‌های ضروری به طور عمده با دخالت سلول‌های کلراید صورت می‌گیرد (Drake *et al*., 2013). با توجه به روند رو به کاهش منابع آب شیرین و افزایش درجه شوری آب رودخانه‌ها بویژه در استان خوزستان که منبع تامین آب استخرهای پرورش ماهیان گرمابی می‌باشند، این تحقیق صورت گرفت تا مشخص شود که ماهی کپور معمولی تا چه اندازه می‌توانند بدون تغییر در ساختار و آسیب بافت‌ها بویژه سلول‌های دخیل در تنظیم اسمزی آبشش در مقابل شوری مقاومت کند تا یافته‌های این مطالعه در مراکز تحقیقاتی شیلات بویژه در بافت‌شناسی، فیزیولوژی، آسیب شناسی و ایمنی شناسی گونه مذکور و همچنین در پیشبرد بهینه پرورش این گونه بکار گرفته شود.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپورمعمولی با طول متوسط (۰/۵ ± ۱۶/۵ سانتی متر) و وزن متوسط (۱۳/۲± ۶۱/۷ گرم) پس از تهیه از مزرعه پرورش ماهی آزادگان در استان خوزستان به بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شدند. به منظور سازگاری با آب شرب به عنوان منبع تامین آب شیرین به مدت ۹۶ ساعت داخل مخازن ۱۰۰ لیتری حاوی آب لوله کشی کلر زدایی شده در دمای $^{\circ}C$ ۲۶-۲۲ و pH=۷/۸ قرار گرفتند. در طول مدت سازگاری تغذیه ماهیان با استفاده از پلت تجاری در دو نوبت و با میزان ۳ درصد وزن بدن انجام گرفت. ترکیب این غذا شامل ۴۳ درصد پروتئین، ۱۸ درصد چربی، ۳۰ درصد کربوهیدرات و ۹ درصد فیبر بود. تعویض آب تانک‌ها به صورت روزانه و پس از اتمام تغذیه جهت جلوگیری از افزایش آمونیاک و سایر متابولیت‌ها انجام می‌گرفت (Blanco Garcia *et al*., 2015). جهت انجام عملیات این تحقیق از ۱۲ عدد آکواریوم شیشه‌ای ۱۰۰ لیتری در کنار یکدیگر و در محیط آزمایشگاه با سه تکرار برای هر تیمار استفاده شد. سپس شوری‌های مورد نظر از طریق انحلال مستقیم مقادیر معین نمک در هر لیتر آب استحصال گردید. در طول مدت مطالعه تثبیت شرایط فیزیکوشیمیایی آب از قبیل میزان آمونیاک، نیتریت، نیترات و pH با تعویض ۳۰ درصد حجم آب، به فاصله هر دو روز یکبار با آب تازه تسهیل گردید. ماهیان بتدریج به شوری‌های ۴ ppt، ۸ ppt، ۱۲ ppt آکواریوم آب شیرین به عنوان تیمار شاهد انتقال و به مدت ۱۴ روز در تیمارهای شوری و تیمار شاهد نگهداری شدند. در طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکو شیمیایی آب از قبیل شوری، دما و pH و اکسیژن محلول با استفاده از رفرکتومتر نوری (Horiba U-10، ژاپن)، دماسنج دیجیتالی (Horiba U-10، ژاپن)، pH متر دیجیتالی (Horiba U-10 ، ژاپن) و دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن مدل TECPEL DO-1609 بطور روزانه اندازه گیری می‌شد که دقت اندازه گیری سنجنده های بالا بترتیب در حد ۱/ ۰درصد، ۰/۱ درجه سانتی‌گراد، ۰/۰۱ واحد pH و ۰/۱میلی‌گرم بر لیتر بود. نمونه گیری در روز صفر و ۱۴ روز بعد از آزمایش انجام گرفت. ماهیان پس از صید، بلافاصله جهت کاهش اثرات عوامل استرس‌زا، در داخل تشت‌های پلاستیکی محتوی یکی از شوری‌های مورد آزمایش که با غلظت ۰/۱ درصد از ۲-فنوکسی اتانول برای بیهوشی ماهیان آماده شده بودند، بیهوش می‌شدند و اندازه‌گیری مربوط به زیست سنجی انجام سپس به وسیله اسکالپل انتهای دو سر دومین کمان آبششی از سمت راست قطع و جدا شده و در محلول فیکساتیو که در ظرف‌های مخصوص نمونه ریخته شده بودند، وارد می‌شد. در مرحله بعد نمونه‌ها جهت تهیه بلوک‌های پارافینی از آنها بترتیب در الکل‌های با درجه صعودی اتانول آبگیری شدند. پس از شفاف سازی در محلول زایلن، آغشتگی در پارافین مایع و در نهایت از بلوک‌های پارافینی برش‌های ۶-۴ میکرونی توسط میکروتوم دورانی مدل (لایکا-آلمان) تهیه و بوسیله هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند (Choi *et al*., 2011). برای مطالعه ایمنوهیستوشیمی، لام‌ها بعد از پارافین زدایی در زایلن و آبدهی در درجات نزولی الکل اتانول در محلول PBS شستشو داده شده و سپس نمونه‌ها وارد محلول A شدند که از PBS، کلراید-سدیم و TWEEN تشکیل شده بود. سپس لام‌ها به محلول B آغشته شدند که از ترکیب PBS و Regiler تشکیل شده بود. سپس لام‌ها به مدت ۲ دقیقه در PBS آب کشیده شده و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب طوری قرار داده شدند که برشها به طرف بالا بود. روی هر لام ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی کور $IgG\alpha_5$ رقیق شده در PBS اضافه شد، و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شده سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی کور FITC روی هر لام اضافه شد و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگهداشته شده سپس در محلول PBS آب کشی شدند. جهت پی بردن به درستی کارکرد این آنتی کور، به تعدادی از لام‌ها آنتی کور اول اضافه نشد ولی آنتی کور دوم اضافه گردید. بنابراین، لام های مذکور فاقد هرگونه خاصیت فلورسانس خواهند بود. تمامی لام‌ها بعد از قرار دادن لامل روی آنها در جعبه‌های مخصوص چیده شده و برای حفظ خواص فلورسانس در جای تاریک نگهداری شدند. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

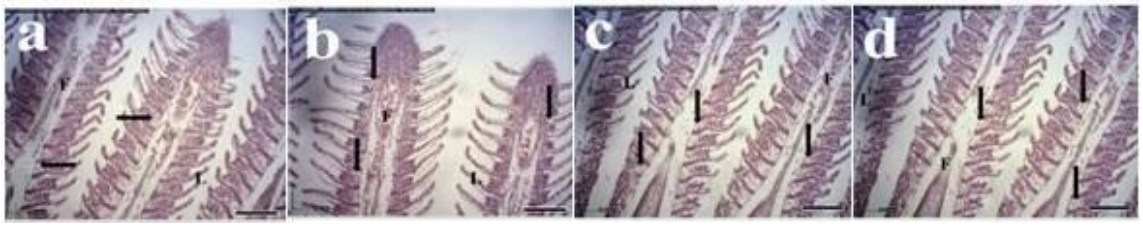
مدل (Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak 1-Lambda Lamp, Japan) با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتری مشاهده و عکس برداری انجام گرفت (Khodabandeh *et al*., 2009a; Khodabandeh *et al*., 2009b). جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره قطعات بافتی در گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد تثبیت شده و پس از خارج نمودن از فیکساتیو با بافر فسفات ۰/۱M (pH=۷/۴) شستشو داده شدند، سپس نمونه‌ها در سری‌های افزایشی اتانل و سپس استن خالص آبگیری شدند. در ادامه قطعات بافتی بوسیله نیتروژن مایع بسرعت منجمد و با استفاده از چسب غیررسانای دوطرفه بگونه‌ای روی پایه‌های مسی قرار داده شدند که کمان‌آبششی عمود بر پایه و سطح رشته آبششی افقی قرار گیرد. نمونه‌ها در دستگاه sputter coater (Edwards مدل SC7620) کاملاً خشک و با طلا روکش شدند. نمونه‌ها پس از این مراحل آماده سازی، تحت میکروسکوپ الکترونی نگاره LEO (مدل 1455VP) با ولتاژ ۱۵ kV بررسی شدند. تصاویر میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰۰ و ۵۰۰ از ۴ منطقه از سطح آوران فیلامنت، نزدیک به محل اتصال فیلامنت به کمان آبششی از هر ماهی تهیه و جهت بررسی‌های بعدی ذخیره شد. تعداد دهانه‌های سلول‌های کلراید در هر تیمار با استفاده از تصاویر تهیه شده با استفاده از نرم افزار Image tools 3.00 شمارش شد (Perry *et al*., 2012). جهت حذف قسمت‌های غیر از لبه آوران فیلامنت در تصاویر، نواحی آوران به صورت مستطیل با مساحت ۰/۰۳۶۵۵-۰/۰۰۳۸۴ میلی‌مترمربع برش داده شد. تراکم دهانه‌های مورد نظر (تعداد در میلیمترمربع) در هر تصویر با توجه به مساحت همان تصویر محاسبه و میانگین آن برای هر ماهی بدست آمد. برای آنالیز داده‌های مستخرج از اندازه گیری تراکم MRC ها در فیلامنت (تعداد در mm^2) و مساحت دهانه های راسی MRC ها (μm^2) از حداقل پنج داده از هر تیمار در هر زمان نمونه‌گیری به صورت میانگین±خطای استاندارد (mean±SEM) استفاده شده است (Tang and Lee, 2013). اختلاف بین داده‌ها در تیمارهای مختلف در زمان‌های یکسان نمونه‌گیری و نیز مقایسه داده‌های یک تیمار در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری با آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) در نرم افزار SPSS 16 تحت سیستم عامل Windows7 انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه ها، پس آزمون Duncan برای مقایسه دوبه دوی داده‌ها استفاده شد و اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵ درصد ($P<۰/۰۵$) پذیرفته شد (Perry *et al*., 2012).

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن بود که در طی دوره سازگاری ماهیان در شوری‌های مختلف و شاهد هیچ گونه تلفاتی مشاهده نگردید و تنها در شوری ۱۲ ppt مواردی از تغییرات در شکل ظاهری ماهی‌ها از قبیل بیرون زدگی چشم‌ها به صورت جزئی قابل مشاهده بود. در مطالعات میکروسکوپی (شکل ۱) سلول‌های کلراید بصورت یکسری سلول‌های اسیدوفیل از سایر سلول‌های بافت پوششی آبشش قابل تشخیص بودند. در مطالعه اخیر سلول‌های کلراید در بافت پوششی آبشش در موضع فیلامنت و در راس پلاکت‌های خونی موجود در سینوس‌ها و به صورت کروی و در موضع لاملایی که عمدتاً به صورت سلول‌هایی استوانه‌ای شکل متمایز بودند. انتقال تدریجی ماهی کپور معمولی از آب شیرین به آب شور با تغییرات عمده‌ای در تعداد، توزیع و اندازه سلول‌های کلراید بود بطوریکه این تغییرات در طول دوره ی سازگاری یکسان نبوده و تحت تاثیر مقدار شوری متفاوت بوده است. بر این اساس در طول دوره سازگاری یک روند افزایشی در تعداد و اندازه سلول‌های کلراید در موضع فیلامنتی و یک روند کاهشی در تعداد سلول‌های کلراید لاملایی و عدم تغییر در اندازه این سلول‌ها مشاهده گردید. در موضع فیلامنتی بیشترین تعداد سلول‌های کلراید متعلق به شوری ۸ ppt و کمترین تعداد متعلق به تیمار شاهد مشاهده گردید. همچنین در این موضع بزرگترین اندازه متعلق به شوری ۱۲ ppt و کوچکترین اندازه متعلق به شوری ۴ ppt گزارش گردید. در موضع لاملایی بیشترین تعداد سلول‌های کلراید متعلق به شوری ۴ ppt و کمترین تعداد متعلق به تیمار شاهد بدون تغییر در اندازه گزارش گردید (شکل‌های ۲ و ۳).

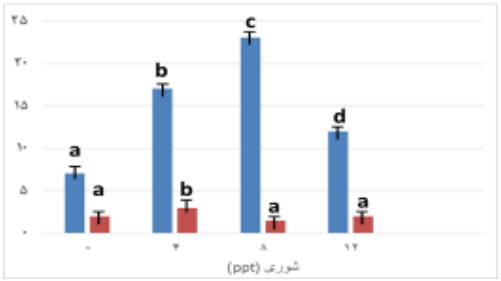
[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]



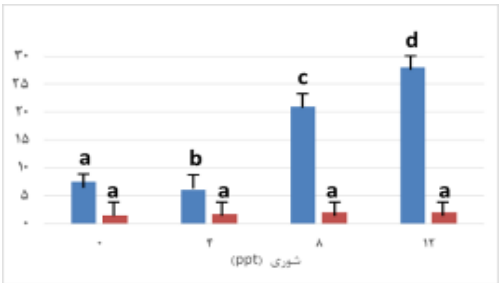
شکل ۱: در این تصویر فیلامنت (F)، لاملا (L) و سلول های کلراید (پیکان‌ها) در رشته‌های آبششی ماهی کپور معمولی در نمونه شاهد (a) و شوری‌های مختلف ۴ ppt (b) ، ۸ ppt (c) و ۱۲ ppt (d) نشان داده شده اند (H&E, x725).

Figure 1: In this image, the filament (F), lamella (L), and MRCs (arrows) in the control (a) and different salinity, 4ppt (b), 8ppt (c) and 12ppt (d) in the gill of *Cyprinus Carpio* are shown (H & E, x725).



شکل ۲ . تعداد سلول‌های کلراید (محور عمودی) موجود در دو موضع فیلامنتی (آبی) و لاملایی (قهوه ای) پس از انتقال به شوری‌های مختلف بر حسب (mean±SEM) و (p<۰/۰۵) حروف غیرمشابه نشان از اختلاف معنی‌داری می باشد.

Figure 1 . The number of chloride cells (vertical axis) in both filamentous (blue) and lamellar (brown) positions after transfer to different salinities was considered as (mean±SEM) and (p <0.05) Different letters indicate a significant difference.



شکل ۳ . اندازه سلول‌های کلراید (محور عمودی) در دو موضع فیلامنتی (آبی) و لاملایی (قهوه ای) پس از انتقال به شوری‌های مختلف بر حسب (mean±SEM) و (p<۰/۰۵) حروف غیرمشابه نشان از اختلاف معنی‌داری می‌باشد.

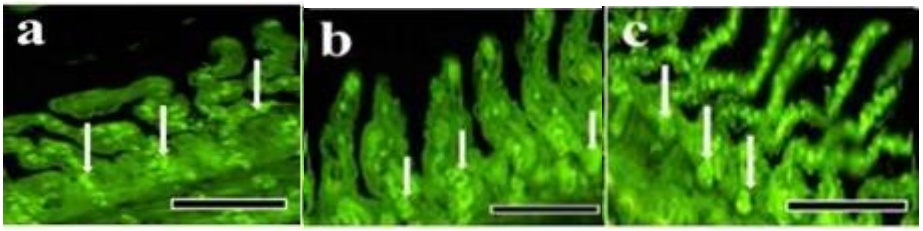
Figure 2 . The size of chloride cells (vertical axis) in both filamentous (blue) and lamellar (brown) positions after transfer to different salinities was considered as (mean±SEM) and (p <0.05) Different letters indicate a significant difference.

در مطالعات ایمونوهیستوشیمی جهت مکان‌یابی سلول‌های کلراید پس از قرارگیری ماهیان با شوری های مختلف و بررسی تغییرات شدت واکنش پذیری اپیتلیوم آبشش نسبت به آنتی بادی بکار رفته در طول دوره تفاوت‌های

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

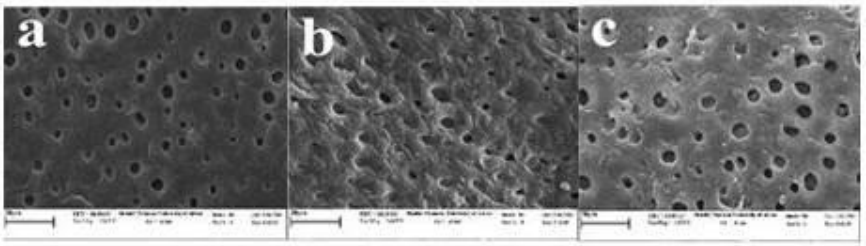
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

قابل ملاحظه‌ای نمایان شد. در مکان‌یابی Na^{+}/K^{+}-ATPase مشخص گردید که سلول‌های کلراید به تعداد زیاد در اپیتلیوم فیلامنتی و به تعداد کمتر در اپیتلیوم لاملایی در شوری‌های مختلف دیده شدند. این سلول‌ها در قسمت راسی، پایه و بین لاملاها بر روی فیلامنت بین لاملایی حضور داشتند. بر اساس مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره غشای رأسی سلول‌های کلراید آبشش ماهی کپور معمولی، مرفولوژی متفاوتی از انواع دهانه‌های راسی این سلول‌ها را نشان داد که شامل فرورفتگی‌های عمیق، کم عمق و برآمده را می‌توان نام برد. بدین ترتیب در آبشش ماهیان سازش یافته با شوری ۴ppt تمام فرم-های ساختار رأسی سلول‌های کلراید، در شوری ۸ppt نیز هر ۳ نوع سلول‌های کلراید و در شوری ۱۲ppt هر ۳ نوع سلول‌های کلراید ولی حضور سلول‌های کلراید با دهانه‌های رأسی عمیق بیشتر قابل مشاهده بود (شکل‌های ۴ و ۵).



شکل ۴: در این تصویر سلول‌های کلراید (MRCs) به روش مکان‌یابی آنزیم Na+, K+- ATPase در رشته‌های آبششی ماهی کپور معمولی در شوری‌های مختلف ppt ۴ (a)، ppt ۸ (b) و ppt ۱۲ (c) نشان داده شده اند. مقیاس=40µm.

Figure 4: In this image, MRCs are shown by Immunolocalization of Na+, K+- ATPase enzymes in the gill of *Cyprinus Carpio* in different salinity. 4ppt (a), 8ppt (b) and 12ppt (c). µm = 40.



شکل ۵: میکروسکوپ الکترونی نگاره اشکال متنوع سلول‌های کلراید (MRCs) براساس مورفولوژی ناحیه رأسی در اپیتلیوم آبشش ماهی کپور معمولی در شوری‌های های مختلف ppt ۴ (a)، ppt ۸ (b) و ppt ۱۲ (c) نشان داده شده‌اند. مقیاس µm=۲۰.

Figure 5: Electron microscopy of mitochondrial rich cells (MRCs) in gill epithelium of *Cyprinus Carpio* based on different morphology of apical area in different salinity. 4ppt (a), 8ppt (b) and 12ppt (c). µm = 20.

بحث

آبشش‌ها در ماهیان استخوانی در هر کمان دارای تعداد فراوانی رشته که توسط هزاران تیغه آبششی اولیه حمایت می‌شوند که برای مبادله گازها بسیار کارامد می‌باشند. تبادل موثر گازها در ماهیانی که با آبشش تنفس می‌کنند با توجه به برقراری خون و آب لازم در مجاورت یکدیگر و در دو سوی غشایی که ضخامت آن به اندازه یک یا دو لایه سلولی می‌باشد (Tse *et al*., 2006). تیغه‌ها از سلول‌های پوششی نازک در خارج و غشاهای پایه نازک به همراه سلول‌های پیلار یا ستونی در داخل تشکیل شده‌اند. این وضعیت به سلول‌های خونی امکان می‌دهد تا بدون ایجاد تغییرات عمده در شکل خود، در داخل تیغه‌ها جریان یابند. از مهم‌ترین این سلول‌ها سلول‌های کلراید که آنها را سلول‌های یونی یا سلول‌های غنی از میتوکندری نیز می‌نامند، در انتقال یون ها دخالت دارند. در ماهیان سازگار شده با محیط‌های آب شور غشاء رأسی این سلول‌ها فنجانی شکل بوده و کل توده سلولی توسط سلول‌های فرعی پوشیده شده است. اتحاد این دو سلول در نهایت به ایجاد یک واحد ترشح کننده کلرید سدیم تحت عنوان غده ترشح کننده نمک می‌انجامد (Evans, 2009).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

از سویی، سلول‌های پوششی کناری با سلول‌های کلراید و سلول‌های جانبی اتصالات محکمی با نفوذپذیری بسیار پایین برقرار می‌نمایند. سطح رأسی سلول‌های کلراید بسیار انعطاف پذیر و دارای یک فرورفتگی می‌باشد. تغییر شکل این فرورفتگی در محیط‌های مختلف از ابزارهای مهم در تشخیص سلول‌های کلراید آب شور از انواع آب شیرین می‌باشد. این فرورفتگی‌ها در محیط آب شور به یک چین عمیق و در آب شیرین غنی از یون‌ها به یک چین کم عمق و در آب‌های شیرین با غلظت یونی پایین به یکسری ریز پرز تغییر شکل می‌دهند (Saillant *et al.*, 2003). تنظیم اسمزی و سازگاری به شوری مختلف شامل هماهنگی پاسخ های فیزیولوژیک در عملکرد چندین ارگان تنظیم کننده اسمزی می‌باشد که تنظیم آب و یون-ها را در آبشش‌ها، کلیه، روده و پوست برعهده دارند (Bodinier *et al.*, 2009). در این مطالعه پس از انتقال تدریجی ماهیان به شوری‌های ppt ۰، ppt ۴، ppt ۸ و ppt ۱۲ طی دو هفته هیچگونه تلفاتی مشاهده نگردید و به عبارتی، میزان بقاء در طول این مدت در شوری‌های مختلف صد درصد بوده است. از سویی، در بررسی اثرات تغییرات شوری در قدرت تحمل ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) تحت تاثیر درجه شوری در قدرت تحمل این گونه ماهی در مواجهه با افزایش آنی شوری محیط مشخص گردید که مقایسه میزان تلفات پس از انتقال مستقیم ماهیان از آب شیرین به شوری تقریبی ۱۸، ۱۶، ۱۴، ۱۲، ۱۰، ۸، ۶، ۲ در هزار بیانگر آغاز تلفات معنی دار از شوری ۱۴ در هزار و ۴۸-۲۴ ساعت پس از انتقال به آب شور بود. لیکن افزایش میزان تلفات به صورت یک فرآیند تصاعدی، متاثر از شدت شوری بوده لذا در شوری ۱۸ در هزار مرگ و میر ماهیان به صد در صد رسید (Fridman *et al.*, 2011). در مطالعه اخیر مکان‌یابی سلول‌های کلراید به کمک تکنیک ایمونوهیستوشیمی مشخص گردید که این سلول‌ها در دو موضع فیلامنتی و لاملایی به طور کامل قابل تشخیص می‌باشند. سلول‌های کلراید فیلامنتی در فضای بین لاملایی و بیشتر در قسمت قاعده‌ای که به صورت ساختارهای تقریباً کروی در تمامی شوری‌ها و به تعداد بیشتری در شوری‌های بالاتر مشاهده شدند. از سوی دیگر، سلول‌های کلراید لاملایی در قسمت لاملای آبششی و به شکل تقریباً استوانه‌ای در تمامی شوری‌ها و بیشتر در شوری‌های پایین‌تر قابل مشاهده بودند. در رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین این سلول‌ها دارای اندازه بزرگتری نسبت به سایر سلول‌ها و متمایل به رنگ ائوزین بودند. در مطالعه بر مارماهی آمریکایی *Anguilla rostrata* تجمع سلول‌های کلراید در قاعده فیلامنت و در میان پلاکت‌های خونی توده‌های متراکمی را در اپیتلیوم فیلامنتی حاشیه عروق وابران و در مجاورت سلول‌های موکوسی تشکیل داده بود (Brauner *et al.*, 2012). از سویی، در گونه مارماهی آمریکایی *A. rostrata* این سلول‌ها به صورت پراکنده در راس لاملا و در موضع سطحی‌تری نسبت به سلولهای گونه مهاجر *Anguilla Anguilla* قرار گرفته بودند (Duggan *et al.*, 2014). همچنین محققین بر این باورند که انواعی از سلول‌های کلراید که در فیلامنت آبششی و در رأس پلاکت‌های خونی قرار گرفته‌اند، به طور عمده کروی هستند که حضور غضروف پشتیبان در موضع به عنوان عامل موثر در اندازه و شکل سلول‌های کلراید موجود در این منطقه خواهد بود و انواعی از سلول‌های کلراید که در موضع لاملایی قرار گرفته‌اند، عموماً استوانه‌ای شکل می‌باشند. تفاوت‌های مرفولوژیک در این سلول‌ها بازتابی از نوع سازگاری ایجاد شده با محیط هیپوتونیک یا هیپرتونیک می‌باشد (Tang and Lee, 2013). در مارماهی مهاجر سازگار شده به آب شیرین سلول‌های کلراید استوانه‌ای شکل به فرم سلول‌هایی باریک با اشکال نامشخص و در انواع سازگار شده با آب شور به صورت سلول‌های بیضی شکل متمایز می‌باشند. علاوه بر آن، در تعدادی از ماهیان یوری هالین سازگار شده به آب شور، حضور یکسری چین‌های غشایی رأسی به اثبات رسیده است. لیکن در مارماهی مهاجر *A. anguilla* حضور چین‌های غشایی نمی تواند به عنوان عاملی مناسب در ارزیابی راندمان تنظیم اسمزی قلمداد گردد (Huang *et al.*, 2011). نتایج حاصل از این تحقیق همسو با تحقیقات اخیر در زمینه شکل ظاهری سلول‌های کلراید می‌باشد. در مطالعات انجام شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره بر گونه

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

مورد مطالعه در شوری‌های مختلف سه تیپ از شکل ظاهر غشای رأسی در سلول‌های کلراید گزارش شد. در تیلاپیای تطابق یافته با آب شیرین سلول‌های کلراید را با توجه به شکل ظاهری غشای رأسی در مطالعات انجام شده با میکروسکوپ الکترونی به سه دسته تقسیم کردند که در نوع اول دارای سطحی مقعر با نحوه قرار گرفتن متنوع ریزپرز روی آن و سطح دو بعدی نسبتا بزرگ می‌باشند. سطح انواع گروه دوم مسطح بوده و پایین تر از سلول‌های پوششی مجاور قرار می‌گیرند. تراکم نوع اول در محیط‌های با غلظت پایین کلرید سدیم و تراکم نوع دوم در محیط‌های با غلظت پایین از یون کلسیم افزایش می‌یابد که نقش آنها در برداشت یون‌های سدیم، کلر و پتاسیم می باشد (Kaneko *et al*., 2008). نحوه قرار گرفتن سلول‌های نوع سوم مشابه نوع دوم است ولی شکاف‌های رأسی آنها عمیق‌تر و مشابه سلول‌های کلراید ماهیان آب شور می‌باشد (Shen *et al*., 2007). در نوعی مینو ماهی *Carassius auratus auratus* سلول‌های کلراید نوع سوم در پاسخ به شرایط اسیدی افزایش می‌یابند که می‌تواند بیانگر نقش این سلول‌ها در ترشح اسید باشد (Fielder *et al*., 2007). در سایر گونه‌ها مانند قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* این تقسیم بندی عملی نمی‌باشد و تحت تیپ‌های سلول‌های کلراید را می‌توان فقط بر پایه ظاهر آنها در قسمت رأسی تقسیم‌بندی کرد (Fridman *et al*., 2011). در این مطالعه بالا بودن تراکم سلول‌های کلراید در ماهیان سازگار شده با آب شور امری مشهود بنظر می‌رسد. همچنین در طول دوره سازگاری با شوری‌های مورد آزمایش سلول‌های کلراید به طور عمده در موضع فیلامنتی و لاملایی قابل مشاهده بودند بطوریکه در شوری‌های بالاتر بیشتر سلول‌های کلراید در قاعده لاملاها و فضای بین تیغه‌ای آبشش متمرکز شده بودند. محققین در مطالعه بر قزل آلای جویباری *Salvelinus fontinalis*، ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*) و تاس ماهی خلیج مکزیک *Acipenser oxyrinchus desotoi* که در تنش شوری‌های مختلف قرار گرفته بودند نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند. این محققین بر این باورند که طی سازگاری با شوری باعث جابجایی، باز سازی مداوم، کاهش و از بین رفتن سلول‌های کلراید می‌شود که این عملکرد یکی از استراتژی‌های بقاء ماهیان در مواجهه با شوری می باشد (Gravel *et al*., 2009; Khodabandeh *et al*., 2009a). بنابراین، براساس نتیجه مطالعه اخیر که بر اساس تاثیر شوری‌های مختلف محیطی بر سلول‌های کلراید آبشش ماهی کپور معمولی به روش ایمونوهیستوشیمی و فراساختاری انجام پذیرفت می‌توان نتیجه گرفت که قدرت تحمل و سازش پذیری کپور معمولی نسبت به تغییرات شوری محیط، به دلیل ایجاد تغییرات سریع در سلول‌های کلراید جهت تنظیم میزان ورود و خروج آب و الکترولیت‌ها بالا بوده بطوریکه که گونه مورد نظر توانسته است نسبت به تغییرات شوری‌های محیطی خود را تطبیق داده و به ادامه حیات خود ادامه دهد.

منابع

اینانلو، ک.، علی نژاد، س، زحمتکش، ع و امینیان فتیده، ب.، ۱۳۹۸. مقایسه اثر جیره‌های حاوی پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Pediococcus pentosaceus* بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی بچه ماهی کپور معمولی *C*(*yprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۸ (۳): ۱۸۵-۱۹۴. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119392

باصری ارغوانی، ح.، عسکری ساری، ا و جواهری بابلی، م.، ۱۳۹۸. تاثیر افزودن اتیلن دی آمین تترا استیک اسید به جیره غذایی بر کاهش میزان عناصر سنگین در گوشت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۳): ۱-۱۲. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119104

جمیلی، م.، ۱۳۷۰. بررسی میزان تحمل نسبی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) در مقابل تغییرات شوری. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه ازاد اسلامی واحد اهواز، ۷۳ص.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

قاضی لو، ا.، ۱۳۸۷. مطالعه تغییر تعداد سلولهای کلراید اپیتلیوم آبششی در ماهی زروک در پاسخ به افزایش شوری. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر ، ۶۳ ص.

Blanco Garcia, A., Partridge, G. J., Flik, G., Roques, J. A. qnd Abbink, W., 2015. Ambient salinity and osmoregulation, energy metabolism and growth in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833) in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*, 46: 2789–2797. DOI: 10.1111/are.12433.

Bodinier, C., Lorin-Nebel, C., Charmantier. G. and Boulo, V., 2009. Influence of salinity on the localization and expression of the CFTR chloride channel in the ionocytes of juvenile Dicentrarchus labrax exposed to seawater and freshwater. *Comparative Biochemistry & Physiology A*, 53:345-351. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.03.011.

Brauner, C.J., Gonzalez, R.J. and Wilson, J.M., 2012. Extreme environments: hypersaline, alkaline, and ion-poor waters. In *Fish physiology* , 32: 435-476. Academic Press. DOI: 10.1016/*j*.devcel.2012.10.015.

Choi, J.H., Lee, K.M., Inokuchi, M. and Kaneko, T., 2011. Morphofunctional modifications in gill mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia transferred from freshwater to 70% seawater, detected by dual observations of whole-mount immunocytochemistry and scanning electron microscopy. *Comparative Biochemistry & Physiology A*, 158 (1): 132-142. DOI: 0.1016/j.cbpa.2010.09.019.

Cruz, S.A., Chao, P.L. and Hwang, P.P., 2013. Cortisol promotes differentiation of epidermal ionocytes through Foxi3 transcription factors in zebrafish (Danio rerio). *Comparative* Biochemistry and Physiology Part A: *Molecular & Integrative Physiology*, 164(1): 249–257. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.09.011.

Drake, P., Coleman, L. and Vogwill, R., 2013. The response of semi-arid ephemeral wetland plants to flooding: linking water use to hydrological processes. *Ecohydrology*, 6: 852-862. DOI: 10.1002/eco.1318.

Duggan, M., Connolly, R., Whittle, M., Curwen, G. and Burford M., 2014. Effects of freshwater flow extremes on intertidal biota of a wet-dry tropical estuary. *Marine Ecology Progress Series*, 502: 11-23. DOI: 10.3354/meps10719.

Duncan, W.P., Silva, N.F. and Fernandes, M.N., 2011. Mitochondrion-rich cells distribution, Na^+/K^+-ATPase activity and gill morphometry of the Amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamo-trygonidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 523–531. DOI: 10.1086/605458.

Evans, D., 2009. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. American Journal of Regulatory, *Integrative and Comparative Physiology*, 295: 704-713. DOI: 10.1152/ajpregu.90337.2008.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

Fielder, D.S., Allan, G.L., Pepperall, D. and Pankhurst, P.M., 2007. The effects of changes in salinity on osmoregulation and chloride cell morphology of juvenile Australian snapper, *Pagrus auratus*. *Aquaculture*, *272*(1-4): 656-666.

Fridman, S., Bron, J.E. and Rana, K.J., 2011. Ontogenetic changes in location and morphology of chloride cells during early life stages of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* adapted to fresh and brackish water. *Journal of Fish Biology*, 79: 597–614. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2011.03043.x.

Gonzalez, R.J., Brauner, C.J., Wang, Y.X., Richards, J.G., Patrick, M.L., Xi, W., Matey, V. and Val, A.L., 2010. Impact of ontogenetic changes in branchial morphology on gill function in *Arapaima gigas*. *Physiological and biochemical zoology*, 83, 322–332. DOI: 10.1086/648568.

Gravel, A., Wilson, j. and vijayan, M., 2009. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the Osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with sea water exposure in rainbow trout, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149: 481-490. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.11.002.

Hiroi, J. and McCormick, S. D., 2012. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 184: 257–268. DOI: 10.1016/j.resp.2012.07.019.

Huang, C.Y., Lin, C.P. and Lin, H.C., 2011. Morphological and biochemical variations in the gills of 12 aquatic airbreathing anabantoid fish. *Physiological and biochemical zoology*, 84, 125–134. DOI: 0.1086/658996.

Kaneko, T., Watanabe, S. and Lee, K.M., 2008. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. *Aqua-BioScience Monographs*, 1:1–62. DOI: 10.5047/absm.2008.00101.0001.

Kazemi, R., Bahmani, M., Krayushkina, L.S., Pourkazemi, Pourkazemi, M., Ogorzalek, A., 2003. Changes in blood serum osmalarity and ultrastructure of gill chloride cell in young Persian sturgeon Acipenser persicus (Borodin) of different sizes during adaptation to sea water. *Zoologica Poloniae*, *48*(1–4), pp.5-30.

Khodabandeh, S., Khoshnood, Z. and Mosafer, S., 2009b. Immunolocalization of Na+, K+-ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, Acipenser persicus, fry. *Aquaculture Research*, *40*(3), pp.329-336. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2008.02097.x.

Khodabandeh, S., Shahriarimoghaddm, M., Abtahi, B., 2009a. Changes in chloride cell abundance, Na+, K+-ATPase immunolocalization and activity in the gills of golden grey mullet, *Liza aurata*, fry during adaptation to different salinities. *Yakhteh Medical Journal*, 49-54. *DOI: af97/3f078f7dc7d07404*.

Perry, S.F., Fletcher, C., Bailey, S., Ting, J., Bradshaw, J., Tzaneva, V. and Gilmour,

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

K.M., 2012. The interactive effects of exercise and gill remodeling in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 182:935–945. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.04.214.

Saillant, E., Fostier, A., Haffray, P., Menu, B. and Chatain, B., 2003. Saline preferendum for the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae and juveniles: effect of salinity on early development and sex determination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 287, 103–117. DOI: 10.1016/S0022-0981(02)00502-6.

Shen, I.D., Chiu, Y.H., Lee, T.H. and Hwang, P.P., 2007. Localization of Chloride Transporters in Gill Epithelia of the Grass Pufferfish, *Takifugu niphobles*. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 34 (1), 87-100. DOI: 10.1242/jeb.00895.

Tang, C. and Lee, T., 2013. Freshwater acclimation induces stress responses and expression of branchial Na+/K+-ATPase and proliferating cell nuclear antigen in *Takifugu niphobles*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 319; 409–421. DOI: 10.1002/jez.1804.

Tse, W.K.F., Au, D.W.T. and Wong, C.K.C., 2006. Characterization of ion channel and transporter mRNA expressions in isolated gill chloride and pavement cells of seawater acclimating eels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 1181–1190. DOI: 10.1242/jeb.034785.

Yang, W.K., Kang, C.K., Chang, C.H., Hsu, A.D., Lee, T.H. and Hwang, P.P., 2013. Expression profiles of branchial FXYD proteins in the brackish Medaka *Oryzias dancena*: a potential saltwater fish model for studies of osmoregulation. *Plos One*. 8, e55470. DOI: 10.1371/journal.pone.0055470.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]

Immunohistochemical and ultrastructural study of the effect of different salinities on gill chloride cells of *Cyprinus Carpio*

Basir Z.[1]*; Peyghan R.[2]

*z.basir@scu.ac.ir

1- Department of Basic Science, Faculty of veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Department of Clinical Science, Faculty of veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

120 specimens of common carp were treated in salt water with 4ppt, 8ppt, 12ppt treatments and freshwater with three replications for 2 weeks. For histomorphology study in the end of the period thickness of 4µ to 6µ were prepared. Also samples were collected for immunohistochemical and ultrastructural studies. Results showed that at the filament position, the highest and lowest number of chloride cells belonged to 8 ppt salinity and control treatment, respectively. Also at this position, the largest size of the cells belonged to the salinity of 12 ppt and the smallest size belonging to 4 ppt. At the lamellar site, the highest number of chloride cells belonged to 4 ppt salinity and the lowest number belonged to the control treatment without changing in the size. In immunohistochemical studies for Na^{+}/K^{+}-*ATPase* localization, it was found that chloride cells were high in filament epithelium and few in the lamellar epithelium in different salinities. These cells were present with intense immunofluorescence in the apex, base, and between inter lamellar filament. According to the electron microscopy studies, the membrane of the chloride cells of the gill of common carp showed that different apical morphologies as the deep hole, shallow basin and wavy convex. In general, range of tolerance and adaptation of common carp is high to salinity changes due to rapid changes in chloride cells in the direction of entering and leaving water and electrolytes. So that, this species was able to adapt to the changes in environmental different salinity and to survive.

Keywords: Salinity, Gill, *Cyprinus carpio*, Immunohistochemistry, Ultrastructural

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.3.2]