

مکان‌یابی و بررسی اثر محیط‌های هیپر و هیپواسموتیک بر نحوه پراکندگی آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase در توبول‌های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)

احسان رومیانی^۱، رحیم عبدی^{۲*}، حسین ذوالقرنین^۲، احمد سواری^۲، حسن مروتی^۳

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم جانوری گرایش بافت شناسی آبزیان و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد
۲- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: abdir@kmsu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۱۶

چکیده

هدف: بافت‌شناسی نفرون‌های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) و مکان‌یابی آنزیم Na^+ / K^+ -ATPase در خلال تنظیم اسمزی و تطابق با محیط‌های هیپو و هایپراسموتیک (۶۰ و ۱۰ ppt) با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی.

مواد و روش‌ها: به منظور بافت‌شناسی نفرون‌های کلیوی از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین استفاده شد. مکان‌یابی ایمن‌یابی آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase نیز با استفاده از آنتی بادی‌های اولیه (IgG α_5) و ثانویه FITC انجام شد.

نتایج: مطالعات بافت‌شناسی نشان داد نفرون‌های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی شامل جسمک کلیوی، قطعه گردنی، توبول پروکسیمال اولیه و ثانویه، توبول دیستال و جمع‌کننده می‌باشند. نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نیز نشان داد که در تیمار کنترل آنزیم مذکور در سمت قاعده‌ای-جانبی سلول‌های اپیتلیال توبول‌های کلیوی بچه ماهی هامور حضور داشته اما در گلومرول‌ها حضور ندارد. در محیط‌های هیپواسموتیک و هیپراسموتیک نیز به مانند تیمار کنترل آنزیم در سمت قاعده‌ای-جانبی سلول‌های اپیتلیال توبول‌ها حضور دارد اما در ساختار گلومرول‌ها حضور ندارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اطلاعات بدست آمده در این تحقیق می‌توان به این نتیجه رسید که ساختار نفرون‌ها در کلیه ماهی هامور معمولی شبیه ساختار آن در سایر گونه‌های ماهیان یوری هالین می‌باشد. همچنین، حضور آنزیم در سمت قاعده‌ای-جانبی سلول‌های اپیتلیال کلیوی نشان‌دهنده حضور فعال این آنزیم در فرایند تنظیم اسمزی می‌باشد.

واژگان کلیدی: هامور معمولی، نفرون‌های کلیوی، Na^+ / K^+ -ATPase، مکان‌یابی ایمن‌یابی، تنظیم اسمزی

مقدمه

آنزیم اساسا در سلول های غنی از میتوکندری اپیتلیوم آبشش (۱۰) و اپی تلیوم توبول های کلیوی (۱۱) ماهیان استخوانی یوری هالین حضور دارد. هامور معمولی از ماهیان اقتصادی خلیج فارس می باشد که در سایت های تکثیر و پرورش جنوب کشور تکثیر می یابد. این ماهی همچنین دارای میزان صید بالایی در سواحل خلیج فارس می باشد. نظر به تولید و رهاسازی این ماهی در آب های ساحلی و تغییرات شوری این آب ها، در این تحقیق سعی شده است تا علاوه بر بافت شناسی توبول های کلیوی به عنوان اندام مهم در تنظیم اسمزی، آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$ که از مهم ترین آنزیم های درگیر در روند تنظیم اسمزی می باشد و بخش عمده ای از انرژی مصرفی در تنظیم اسمزی را به خود اختصاص می دهد، با استفاده از روش مکان یابی ایمنیایی این آنزیم در طی روند سازگاری این ماهی با شوری های مختلف، مکان یابی شود.

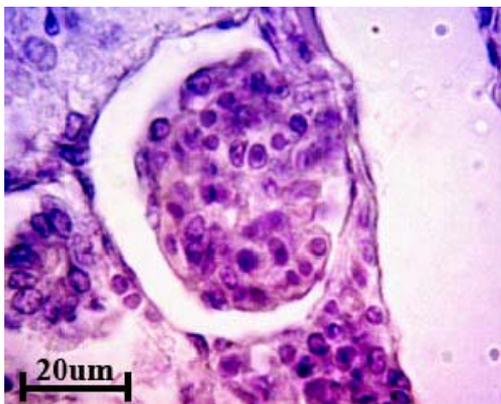
مواد و روش ها

نمونه های مربوط به این تحقیق از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) وابسته به پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور تهیه شدند. هوا بین ۲۲-۲۰ درجه سانتی گراد حفظ، دوره فوتوپریود ۱۲ ساعت، pH نیز بین ۷/۷-۷/۸ حفظ شد و تغذیه ماهیان توسط غذای ماهی (Biomar (China) انجام شد. به منظور انجام آزمایش بچه ماهیان 3 ± 0.4 گرمی هامور معمولی پس از یک هفته آداپتاسیون، به محیط های هیپواسموتیک (آب با شوری پایین) (10 ppt) و هیپراسموتیک (آب با شوری بالا) (60 ppt) انتقال داده شدند. طول دوره این آزمایش ۴ هفته بود که پس از اتمام آن به طور تصادفی از ماهیان نمونه برداری شد و ماهیان توسط محلول گل میخک بی هوش شدند. سپس، سر و قطعه دمی جدا و دستگاه گوارش خارج گردید و نمونه ها به منظور تثبیت به محلول بوئن (متشکل از اسیدپیکریک اشباع، فرمالین تجاری و اسید استیک گلاسیال) منتقل و به آزمایشگاه بافت شناسی و جنین شناسی آریزان دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انتقال داده شدند. نمونه ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از بوئن خارج و برای از بین بردن بقایای رنگ زرد ماده تثبیت کننده چندین بار در الکل ۷۰ درصد شستشو و برای انجام مراحل بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی، نمونه ها با استفاده از سری افزایشی اتانول آب گیری و سپس پارافینه شدند (۱۲). در مرحله بعد، از قالب ها برش های سریالی از بخش دفعی توبول های کلیوی به ضخامت ۵

ماهی هامور معمولی از خانواده Serranidae، یک گونه یوری هالین می باشد که بیشتر در مناطق استوایی و نیمه استوایی زندگی می کند (۱). هامور ماهیان در اکثر کشورهای جنوب شرق آسیا جز ماهیان مهم پرورشی محسوب می شوند و به دلیل داشتن گوشت لذیذ و غنی، دارای ارزش اقتصادی بالایی هستند. هامور معمولی ساکن آب دریا می باشد، بنابراین نسبت به محیط خود هیپواسموتیک است. در این شرایط مکانیسم های هیپواسمورگولاتوری (Hypoosmoregulatory) روش های جبرانی برای جبران از دست رفتن آب و تهاجم یون ها می باشد. قابلیت تنظیم اسمزی و یونی در جانوران آبی آن ها را برای تطابق با شرایط مختلف محیط از جمله تغییرات شوری توانمند ساخته است (۲). در این شرایط بواسطه نوشیدن آب از دهیدراته شدن شدید جلوگیری می شود و آب توسط روده جذب شده و یون های اضافی هم توسط آبشش ها و کلیه ها دفع می شوند (۳ و ۴). حفظ تعادل پایدار محیط درونی برای زندگی در محیط های گوناگون توسط مهره داران ضروری به نظر می رسد. در پاسخ به این تغییر شرایط محیطی اپی تلیوم انتقال دهنده نقش مهمی را در انتقال یون ها ایفا می کند. تنظیم اسمزی در تلوستها بواسطه یک سری از بافت ها و اندام ها شامل آبشش، کلیه و روده انجام می شود (۵). کلیه یک نقش مهم در تنظیم اسمزی هر دو گروه ماهیان آب شور و شیرین ایفا می کند که البته این ایفای نقش در این دو محیط دارای تفاوت هایی نیز می باشد (۶).

کلیه نقش خود را در تنظیم اسمزی ماهیان استخوانی یوری هالین از طریق تغییر در میزان ادرار و ایجاد تعادل و توازن بین ترشح و باز جذب یون با توجه به شوری و اسمولالیت محیط آبی ایفا می کند (۷). در فرایند تنظیم اسمزی آنزیم های زیادی درگیر هستند که یکی از مهم ترین این آنزیم ها $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$ می باشد که یک آنزیم عمومی غشا پلاسمایی می باشد که به طور فعال سدیم را به خارج و پتاسیم را به داخل سلول های جانوری انتقال می دهد (۸). این آنزیم یک ATPase تیپ P می باشد و از دو زیر واحد (α) و (β) تشکیل شده است. α زیر واحد کاتالیتیک آنزیم بوده و وزن مولکولی آن در حدود ۱۰۰ کیلو دالتون می باشد. زیر واحد β کوچکتر و گلیکوزیله می باشد و وزن مولکولی ای در حدود ۵۵ کیلو دالتون دارد (۹). مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نشان داده اند که این

بدون حاشیه مسواکی تشکیل شده بود. همچنین این قطعه فاقد حاشیه مسواکی بود اما تعدادی میکروویلی کوتاه بر روی سطح لومینال سلول های اپیتلیال آن وجود داشت. توپول پروکسیمال I دارای سلول های مکعبی با هسته قاعده ای و میکروویلی هایی در رأس (حاشیه مسواکی) بود که به داخل لومن کشیده شده بودند.



شکل ۱: جسمک کلیوی در ساختار نفرون های کلیوی بچه ماهی هامور معمولی *E. coioides* فیکساتیو بوئن، رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین.

قطعه پروکسیمال II نیز دارای سلول های مکعبی بود اما در این قطعه سلول های اپیتلیال نسبت به قطعه I بلندتر بوده و هسته آنها نیز تاحدودی به سمت مرکز سلول متمایل شده بود. همین طور در این قطعه از تراکم میکروویلی های حاشیه مسواکی کاسته شده بود (شکل ۲ و ۳). سلول های اپیتلیال توپول های دیستال مکعبی و بلند تر از قطعات قبلی بوده و هسته آنها نیز تقریباً گرد و در وسط سلول مشاهده شد. از این قطعه به بعد هیچ گونه میکروویلی ای مشاهده نشد (شکل ۲). توپول های جمع کننده بواسطه داشتن سلول های مکعبی بلند، فاقد حاشیه مسواکی و هسته های بیضی تا گرد و تقریباً میانی تشخیص داده شدند (شکل ۲).

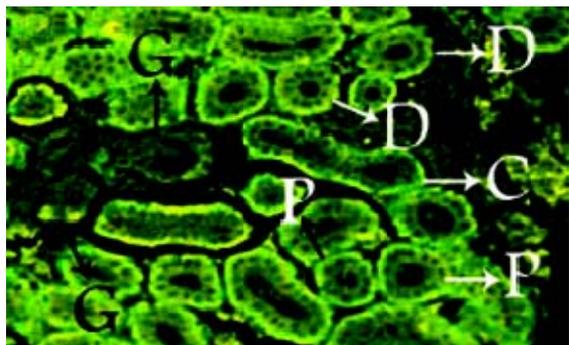
مطالعه ایمونوفلئورسانس لامها نشان داد که آنزیم Na^+/K^+ -ATPase در سمت قاعده ای- جانبی سلول های غنی از میتوکندری توپول های کلیوی (پروکسیمال، دیستال و جمع کننده) حضور داشتند، اما در ساختار گلمرولها حضور آنزیم تشخیص داده نشد (شکل ۴). در تیمارهای هیپواسموتیک و هیپرسموتیک نیز مانند تیمار شاهد، حضور آنزیم بواسطه تولید نور فلئورسانس در سمت قاعده ای- جانبی سلول های غنی از میتوکندری در توپول های پروکسیمال، دیستال و جمع کننده تشخیص داده شد. اما، در گلمرولها هیچ گونه ایمونوفلئورسانسی مشاهده نشد (شکل های ۵ و ۶).

میکرون با استفاده از میکروتوم نیمه دیجیتال LEICA مدل RM2245 ساخت کشور آلمان تهیه گردید. برای مطالعات بافت شناسی لامها به وسیله هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی که در آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس واقع در شهرستان نور انجام شد. برشها پس از تهیه بر روی لامهایی با پوشش Poly-L- Lysin قرار داده شدند و مکان یابی سلول های غنی از میتوکندری و آنزیم Na^+/K^+ -ATPase بر طبق روش (۱۲، ۲، ۱۳، ۱۴) انجام شد. بدین صورت که، لامها بعد از پارافین زدایی و آبدهی در درجات صعودی اتانول در محلول PBS (Phosphate Buffer Saline) شستشو و در داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب قرار داده شدند. سپس روی هر لام ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی اولیه Monoclonal Antibody Raised Against Mouse IgG α_2 the α -subunit of the Chicken Na^+/K^+ -ATPase; (Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) رقیق شده در PBS اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی ثانویه FITC Isothiocyanate; Monoclonal Mouse Fluorescein (Anti-florescein Antibody; Merck Germany) روی هر لام اضافه و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شدند. سپس لامها توسط PBS شستشو و با استفاده از مایع مونتاز، مونتاز شدند. جهت پی بردن به درستی کارکرد این آنتی بادی، به تعدادی از لامها آنتی بادی اولیه اضافه نشد ولی آنتی بادی ثانویه اضافه گردید.

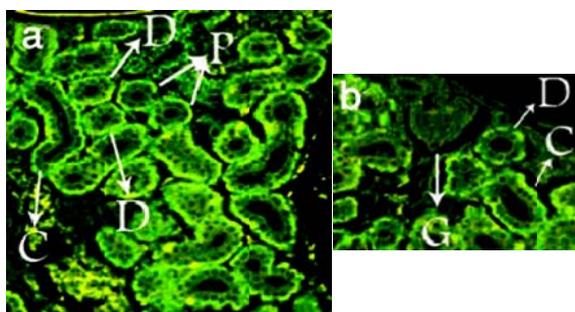
در نهایت مکان یابی ایمینایی Na^+/K^+ -ATPase با استفاده از میکروسکوپ نوری فلئورسانس انجام شد. برای این منظور، از لامها توسط دوربین دیجیتال Olympus متصل به میکروسکوپ فلئورسانس Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak 1- (Lambda Lamp) با فیلترهای اختصاصی 450- 490nm عکس برداری صورت گرفت.

نتایج

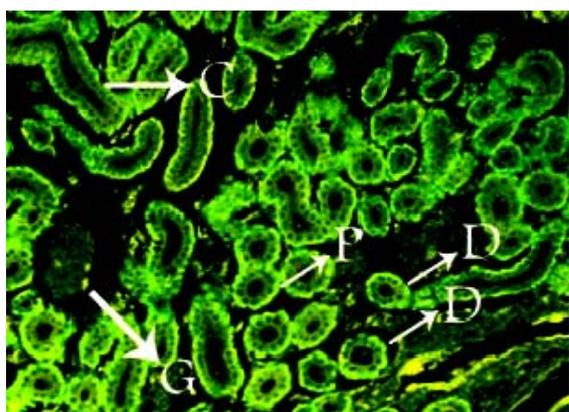
نتایج مطالعات بافت شناسی نشان داد که در *E. coioides* نفرونها از جسمک کلیوی شامل گلمرول و کیپسول بومن (شکل ۱)، قطعه گردنی، توپول های پروکسیمال، دیستال و جمع کننده تشکیل شده اند. قطعه گردنی از سلول های مکعبی کوتاه با هسته های قاعده ای، قطر لومن باریک تر نسبت به سایر قطعات و



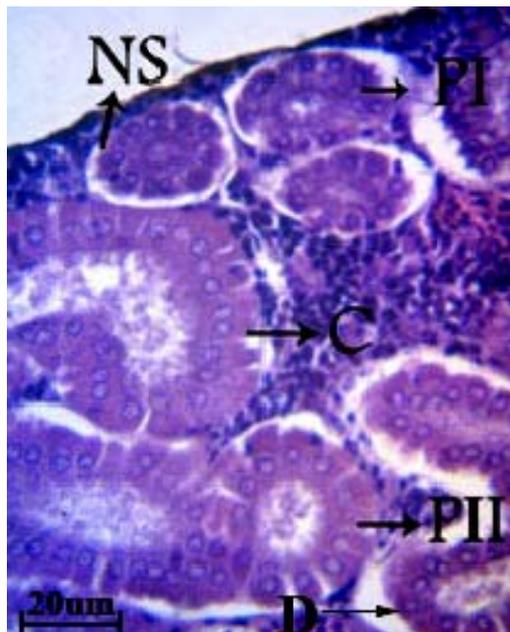
شکل ۴: مکان یابی آنزیم $Na^+/K^+-ATPase$ در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در تیمار کنترل. P: توبول پروکسیمال، D: توبول دیستال، C: توبول جمع کننده و G: گلومرول.



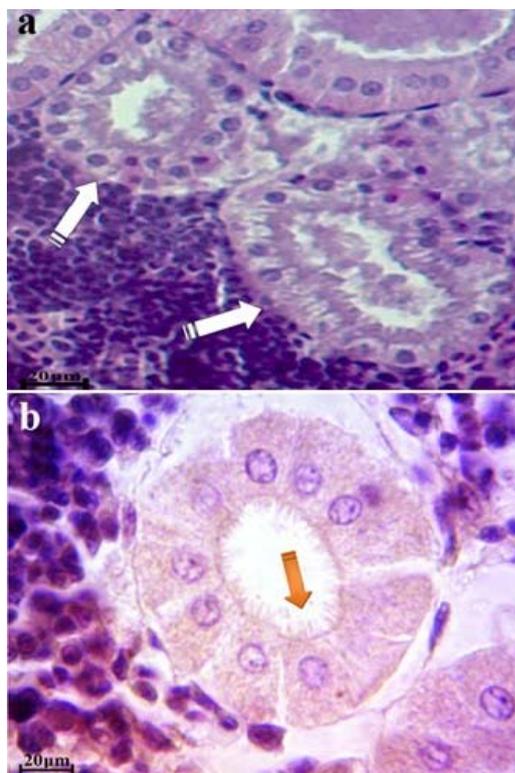
شکل ۵: a و b مکان یابی آنزیم $Na^+/K^+-ATPase$ در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در محیط هیپواسموتیک (آب با شوری پایین) با شوری پایین. P: توبول پروکسیمال، D: توبول دیستال، C: توبول جمع کننده و G: گلومرول.



شکل ۶: مکان یابی آنزیم $Na^+/K^+-ATPase$ در برش عرضی نفرون های کلیوی *E. coioides* در محیط هیپراسموتیک (آب با شوری بالا). P: توبول پروکسیمال، D: توبول دیستال، C: توبول جمع کننده و G: گلومرول.



شکل ۲: توبول های مختلف در ساختار نفرون های کلیوی *E. coioides* فیکسانو بوئن، رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ئوزین. NS (Neck Segment) قطعه گردنی، PI: توبول پروکسیمال اولیه، PII: توبول پروکسیمال ثانویه، D: توبول دیستال و C: توبول جمع کننده.



شکل ۳: a و b توبول های پروکسیمال اولیه و ثانویه در ساختار نفرون های کلیوی *E. coioides* فیکسانو بوئن، رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ئوزین. پیکان منقطع سفید (a)، نشان دهنده توبول پروکسیمال اولیه به همراه حاشیه مسواکی متراکم آن؛ پیکان منقطع نارنجی (b)، توبول پروکسیمال ثانویه به همراه حاشیه مسواکی کم تراکم آن.

بحث

(Na^+/K^+ -ATPase) در واکنش با آنزیم Na^+/K^+ -ATPase ایمونوفلوئورسانس قابل ملاحظه‌ای تولید می‌کند. بنابراین، این آنتی بادی قادر به شناسایی محل حضور سلول‌های غنی از میتوکندری است. نتایج مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی نشان داد که آنزیم فوق در غشاء قاعده‌ای- جانبی توپول‌های پروکسیمال، توپول‌های دیستال و توپول‌های جمع‌کننده، در همه شوری‌ها حضور دارد، اما در گلمرول‌ها وجود ندارد. به عبارت دیگر، آنزیم Na^+/K^+ -ATPase حاضر در غشاء قاعده‌ای- جانبی سلول‌های غنی از میتوکندری توپول‌ها با آنتی بادی ($IG\alpha_5$) واکنش ایمنیایی داده و تولید فلئورسانس می‌نماید. نتایج مشابهی در مورد دیگر گونه‌های ماهیان استخوانی، از جمله در مطالعه تنگ و همکاران (۱۹) بر روی خامه ماهی (*Chanos chanos*) و لین و همکاران (۸) در مطالعه روی بادکنک ماهی خال سبز (*Tetraodon nigroviridis*) گزارش شده است. شدت فلئورسانس مشاهده شده در این مطالعه که بواسطه حضور آنزیم Na^+/K^+ -ATPase ایجاد شده است، می‌تواند نشان از حضور فعال این آنزیم در توپول‌های کلیوی به جهت انجام وظیفه تنظیم اسمزی آنها باشد. همین‌طور تراکم فلئورسانس در غشا قاعده‌ای- جانبی لوله‌ها، می‌تواند بر نقش سلول‌های غنی از میتوکندری در تبدلات یونی و نیز توانایی هیپراسمولاریتی در ماهی هامور معمولی دلالت کند. همین‌طور نبل و همکاران (۱۴) با بررسی آبشش و دستگاه ادراری بچه ماهیان باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) و توانایی تطابق آنها با محیط آب شیرین، مشاهده کردند که آنزیم Na^+/K^+ -ATPase در همه توپول‌ها و مجاری ادراری، و در سمت قاعده‌ای جانبی سلول‌های اپیتلیوم آنها حضور دارد.

خدابنده و همکاران (۱۲) در مطالعه‌ای به منظور مکان‌یابی سلول‌های غنی از میتوکندری در آبشش و دستگاه ادراری تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) مشاهده کردند که این آنزیم در توپول‌های دیستال و جمع‌کننده حضور داشته که توسط تولید نور فلئورسانس قابل مشاهده است. بنا به گفته‌ی نیشی مورا و همکاران (۲۱) در آب شیرین به دلیل کم بودن یون‌های موجود در آب و دفع مقادیر بالای آب، لازم است سلول‌های غنی از میتوکندری موجود در توپول‌های کلیوی به ویژه توپول‌های دیستال و جمع‌کننده با افزایش میزان باز جذب یونی از مایع فیلتر و دفع آب اضافی بدن تعادل یون و آب را حفظ کند (۲۱). اما در گلمرول و توپول پروکسیمال هیچ‌گونه فلئورسانسی را مشاهده نکردند که این نشانگر عدم دخالت آنها

اوگاوا (۱۵) ساختار کلیه ماهیان استخوانی را به پنج دسته تقسیم بندی کرده است. بر اساس این دسته بندی، کلیه ماهی هامور معمولی شبیه اکثر ماهیان استخوانی دریایی، خصوصیات مورفولوژیکی شبیه نوع سوم این دسته بندی را نشان می‌دهد. بنابراین، کلیه ماهی هامور دارای ساختمانی شبیه دیگر ماهیان یورهاین می‌باشد (۱۶ و ۱۷)، یعنی دارای بخش‌های گلمرول، توپول پروکسیمال، توپول دیستال و توپول جمع‌کننده در ساختار نفرون‌هایش است. مطالعات بافت شناسی بخش دفعی کلیه بچه ماهی هامور نشان داد که نفرون‌ها از گلمرول، توپول‌های پروکسیمال، توپول‌های دیستال و توپول‌های جمع‌کننده تشکیل یافته‌اند. همانطور که در بالا گفته شد در ساختار نفرون‌های کلیوی بچه ماهی هامور توپول‌های دیستال تشخیص داده شدند که با بیان هیچمن و همکاران (۱۸) که اظهار داشتند ماهیان استخوانی دریایی فاقد توپول دیستال‌اند (۱۸) مطابقت ندارد. توپول‌های پروکسیمال دارای سلول‌های مکعبی و هسته قاعده‌ای بوده و بواسطه داشتن حاشیه مسواکی از توپول‌های دیستال و توپول‌های جمع‌کننده قابل تمیز اند که این نتایج با نتایج گزارش شده توسط تنگ و همکاران (۱۹) همخوانی دارد. خود توپول‌های پروکسیمال از قطعات I و II تشکیل شده که تعداد میکروویلی در آنها از قطعه I به سمت قطعه II کاهش نشان می‌دهد و از قطعه II به بعد، یعنی در توپول‌های دیستال و جمع‌کننده هیچ‌گونه میکروویلی مشاهده نمی‌شود. ویژگی توپول‌های دیستال داشتن هسته‌های تقریباً کروی و مرکزی می‌باشد. توپول‌های جمع‌کننده نیز مانند توپول‌های دیستال فاقد میکروویلی در لومن خود بوده و بواسطه داشتن سلول‌های مکعبی بلند، هسته‌های بیضوی تا گرد و تقریباً میانی تشخیص داده می‌شوند. نتایج مشابهی در مورد دیگر گونه‌ها از جمله در مطالعه‌ی چرمی (۲۰) بر روی دو گونه‌ی *Hosu hosu* و *Acipenser persicus* و همچنین خدابنده و همکاران (۱۲) بر روی گونه‌ی *Acipenser persicus* گزارش شده است که نشان دهنده ساختار تقریباً مشابه نفرون‌های کلیوی در ماهیان یوری هالین بوده و نیز تایید کننده نتیجه مطالعه حاضر مبنی بر حضور توپول‌های دیستال در ساختار نفرون‌های کلیوی می‌باشد.

با توجه به اینکه یک عملکرد مهم سیستم ادراری تنظیم یونی می‌باشد، اما مکان‌یابی سلول‌های غنی از Na^+/K^+ -ATPase نسبت به آبشش کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۱۴). نتایج این مطالعه روی کلیه بچه ماهی هامور نشان داد که آنتی بادی

منابع

1. Heemstra PC, Randall JE. Groupers of the World (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An Annotated and Illustrated Catalogue of the Grouper, Rock Cod, Hind, Coral Grouper Known To Date. FAO Fisheries Synopsis. Rome, FAO. 1993; 125 (16): 382.
2. Khodabandeh S, Shahriari Moghaddam M, Abtahi B. 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 Med. J.* 2009a; 11(1): 49-54.
3. Kaneko T, Shiraishi K, Katoh F, Hasegawa S, et al. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. *Fisheries Science.* 2002; 68: 1- 9.
4. Hawkings GS, Galvez F, Goss GG. Seawater acclimation causes independent alterations in Na/K- and H-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. *J. Exp. Biol.* 2004; 207: 905-912.
5. Marshall M.S, Grosell M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: Evans DH, Claiborne JB (eds). *The physiology of fishes.* CRC Press, Boca Raton; 2006; 179-214.
6. Myazaki H, Kaneko T, Uchida S, Sasaki S, et al. Kidney specific chloride channel, OmClC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 2002; 99:15782-15787.
7. Flik G, Varsamos S, Guerreiro P.M.G, Fenwich, X. Drinking in (very young) fish. In: Hosen N., Flik G (eds). *Osmoregulation and drinking in vertebrates.* SEB Symposium Series. B. Sci. Pub. Ltd, Oxford; 2002; 54: 31- 47.
8. 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. *Comp. Biochem. Physiol.* 2004; Part A. 138: 287- 295.
9. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na⁺, K⁺-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Amer. J. Physiol.* 1998; 275: 633-650.
10. Wilson JM, Laurent P. Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.* 2002; 293: 192- 213.
11. Ura K, Soyano K, Omoto N, Adachi S, et al. Localization of Na⁺, K⁺-ATPase in tissues of rabbit and teleosts using an antiserum directed against a partial sequence of the α subunit. *J. Zool. Sci.* 1996; 13: 219- 227.

در بازجذب یونی می باشد. اما در مطالعه حاضر در قطعه گردنی و توبول های پروکسیمال هم ایمونوفلوئورسانس مشاهده شد که این نشانگر دخالت توبول های پروکسیمال بخصوص، در ترشح یون های دو ظرفیتی می باشد.

در آب شور توبول پروکسیمال محل اصلی ترشح یون های دو ظرفیتی می باشد (۲۱ و ۲۲). مشخص شده است که یکی از راه های ترشح یون های دو ظرفیتی اگزوسیتوز و زیکول های حاوی یون های دو ظرفیتی از طریق غشاء راسی سلول های اپیتلیال می باشد (۲۳). یکی دیگر از راه های ترشح یون های دو ظرفیتی در توبول پروکسیمال، از طریق هم انتقالی Na^+/Mg^{2+} , Na^+/Ca^{2+} می باشد که آنزیم های این انتقال در قسمت راسی سلول های اپیتلیال توبول های پروکسیمال قرار دارند و نیروی مورد نیاز برای این هم انتقالی از طریق آنزیم H⁺-ATPase در بخش راسی و بیشتر توسط آنزیم Na⁺/K⁺-ATPase واقع در بخش قاعده ای- جانبی سلول های اپیتلیال توبول های پروکسیمال تامین می شود (۲۴).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه در کلیه ماهی هامور معمولی (*E. coioides*)، سلول های غنی از میتوکندری و به تبع آنها آنزیم Na⁺/K⁺-ATPase را می توان به روش ایمینایی مکان یابی کرد. با توجه به اینکه در کلیه *E. coioides*، همه توبول های کلیوی از خود ایمونوفلوئورسانس نشان دادند که این نشان دهنده ی حضور آنزیم Na⁺/K⁺-ATPase در سلول های اپیتلیوم آنها و عدم حضور آن در گلومرول ها می باشد، می توان گفت که سلول های غنی از میتوکندری در محیط های مختلف در فرآیندهای حفظ ثبات محیط داخلی بدن جانور به طور قابل ملاحظه ای دخالت دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری و مساعدت آقای دکتر صابر خدابنده، آقای جمشید امیری مقدم و آقای حسینی کارشناس آزمایشگاه بیولوژی دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس واقع در شهرستان نور و همچنین از زحمات آقای محمدرضا سامانی کمال تقدیر و تشکر را دارند.

12. Khodabandeh S, Khoshnood Z, Mosafer S. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. *Aquaculture Res.* 2009b; 40: 329- 336.
13. Khodabandeh S, Kutnik M, Aujoulat F, Charmantier G, et al. Ontogeny of the antennal gland in the crayfish *Astacusteleostodactylus* (Crustacea, Decapoda): Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase. *Cell Tissue Res.* 2004; 319: 167- 174.
14. Nebel C, Romestand B, Nègre-Sadargues G, Grousset E, et al. Differential freshwater adaptation in juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax*: involvement of gills and urinary system. *J. Exp. Biol.* 2005; 208: 3859-3871.
15. Ogawa M. Comparative study on the external shape of the teleostean kidney with relation to phylogeny. *Sci. Rep. of the Tokyo Daigaku.* 1961; B (10): 61-68.
16. Endo M, Kimura M. Structures and functions of segments in some teleostean nephrons. *Jap. J. Ichthyol.* 1984; 31: 71-78.
17. Katoh F, Cozzi RR, Marshall WS, Goss GG. Distinct Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter localization in kidneys and gills of two euryhaline species, rainbow trout and killifish. *Cell Tissue Res.* 2008; 334: 265-281.
18. Hichman C.P, Trump Jr.B.F. The kidney. In: Hoar W. S., Randall D. J. (eds). *Fish Physiology.* Vol. 1. New York: Academic Press; 1969; 91-239.
19. Tang CH, Wu WY, Tsai SC, Yoshinaga T, et al. Elevated Na⁺/K⁺-ATPase responses and its potential role in triggering ion reabsorption in kidneys for homeostasis of marine euryhaline milkfish (*Chanos chanos*) when acclimated to hypotonic fresh water. *J. Comp. Physiol.* 2010; B, 180: 813-824.
20. Charmi A, Parto P, Bahmani M, Kazemi R. Morphological and Histological Study of Kidney in Juvenile Great Sturgeon (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*). *Amer.-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2010; 7 (5): 505-511.
21. Nishimura H, Fan Z. Regulation of water movement across Vertebrate renal tubules. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003; 136: 479- 798.
22. Beyenbach KW. Kidney sans glomeruli. *Amer. J. Physiol.* 2003; 286: 811- 827.
23. Varsamos S, Nebel C, Charmantier G, Ontogeny of osmoregulation in post embryonic fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 2005; 141: 401-429.
24. Hentschel H, Zierold K. Morphology and element distribution of magnesium secretion epithelium: the proximal tubule segment PII of dogfish, *Scyliorhinus caniculus* (L.). *Euro. J. Cell Biol.* 1994; 63: 32- 42.

Localization and Effect of Hyper and Hypo-osmotic Environments on Distribution of Na⁺, K⁺-ATPase in Kidney Tubules of Juveniles of (*Epinephelus coioides*)

Roomiani E¹, Abdi R^{2*}, Zolgharnein H², Savari A², Morovvati H³

1. Post Graduated of Animal Sciences, Young Researchers Club, Khorramabad Branch of Azad University
 2. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khoramshahr University of Marine Sciences and Technology
 3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ahvaz University of Shahid Chamran
- * Email corresponding author: abdir@kmsu.ac.ir

Received: 7 Dec. 2011

Accepted: 10 Apr. 2012

Abstract

Aim: Histological study of kidney nephrons of *Epinephelus coioides* Juveniles and Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase during osmoregulation and adaptation with hypo- and hyper-osmotic (10 and 60 ppt) conditions.

Material and Methods: H & E staining and IgG α_5 and FITC as primary and secondary antibodies were used for kidney nephrons histological studies and Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase, respectively.

Results: Results of microscopic study indicated that kidney nephrons of juvenile grouper were consisted of Glomerulus, Neck segment, Proximal, Distal and Collecting tubules. Immunolocalization of control group showed that Na⁺, K⁺-ATPase was distributed in all part of nephron structure but glomeruli. In hypo- and hyper-osmotic environments similar to control condition the enzyme distributed into the epithelial cells of proximal, distal and convoluted tubules but was not presence in glomeruli.

Conclusion: The results of present study indicated that, the structure of kidney nephrons of *E. coioides* was similar to that of other euryhaline species and presence of Na⁺, K⁺-ATPase in basolateral portion of cell membrane indicated its active role in osmotic and ionic regulation in kidney.

Key words: Grouper, Kidney Tubules, Histology, Na⁺ K⁺-ATPase, Immunolocalization, Osmoregulation