

## تأثیرات استرس دمایی بر ترمیم بافتی بازوی ستاره شکننده *Ophiocoma scolopendrina* (Lamarck, 1816)

نسیم نوروزی Ph.D، نرگس امراللهی بیوکی Ph.D\*

- دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست‌شناسی دریا، بندرعباس، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Amrollahi@hormozgan.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۲۴

### چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات استرس دمایی بر روند بازسازی بازوی ستاره‌ی شکننده *Ophiocoma scolopendrina* و مقایسه‌ی آن با روند بازسازی در دمای طبیعی بود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، ستاره‌های شکننده *O. scolopendrina* جمع‌آوری شده از جزیره قشم به‌کمک محلول ۳/۵ درصد  $MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$  بی‌حس شدند و دو بازو از هر نمونه ستاره قطع شد. نمونه‌ها به ۶ دسته تقسیم شدند: سه آکواریوم برای نمونه‌های شاهد (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و سه آکواریوم برای نمونه‌های تیمار استرس دمایی (دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد). سپس مجدداً در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت، ۱۴ و ۲۱ روز پس از نخستین برش بازو، نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها پس از فیکس و دکلسیفای شدن، رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

**نتایج:** بررسی‌های بافتی روند بازسازی در نمونه‌های تیمار استرس دمایی نشان داد که سرعت بازسازی در آن‌ها تا روز چهاردهم، بیش‌تر از نمونه‌های شاهد می‌باشد اما از این بازه زمانی به‌بعد تحمل دما خارج از توان آن‌ها بود و منجر به اتوتومی و تخریب دیسک این ستاره‌های شکننده شد. از طرفی یکی از نتایج جالب، آن بود که ستاره‌های شکننده‌ی تحت استرس دمایی، بازوی مینیاتوری خود را در زیر اپی‌درم پوشاننده‌ی محل جراحی بازسازی کردند که شاید مکانیسمی برای حفاظت از بازوی بازسازی شده ظریف و حساس این گونه بوده باشد.

**نتیجه‌گیری:** نمونه‌های تیمار استرس دمایی، به‌علت افزایش سرعت متابولیسمی، سرعت بیش‌تری در فرآیندهای ترمیم و بازسازی از خود نشان دادند اما با طولانی شدن بازه زمانی، ستاره‌ها دچار اتوتومی شده و از بین رفتند.

**واژگان کلیدی:** استرس دمایی، بازسازی، ساختار بافتی، تغییر اقلیم، ستاره شکننده

## مقدمه

عمده تغییرات بیولوژیکی در ساختار و عمل کرد اکوسیستم‌های دریایی، مرتبط با تغییرات آب و هوا در گذشته و آنچه در آینده پیش‌بینی شده می‌باشد (۱ و ۲). تغییراتی که با دخالت انسان سرعت گرفته است، گازهای گل‌خانه‌ای ساطع شده توسط انسان منجر به گرم شدن طولانی مدت و بی‌چون و چرای کره زمین می‌شود و باید توجه داشت که بیش از ۹۰ درصد این گرمای اضافی در اقیانوس‌های جهان ذخیره می‌شود (۳). افزایش دمای اقیانوس‌ها سبب تغییرات بیولوژیکی‌ای نظیر تغییر در بهره‌وری اقیانوس‌ها (۴)، تغییر در توزیع و فراوانی گونه‌ها و حتی تغییر در ساختارهای فیزیولوژیکی ارگانیسم‌ها در مقیاس محلی تا جهانی می‌شوند (۵، ۶).

این تغییرات آب و هوایی و تأثیرات آن بر اکوسیستم‌های دریایی طی دو دهه گذشته، به‌ویژه تهدیدهای دوگانه اسیدی شدن و گرم شدن اقیانوس‌ها، به‌شدت مورد توجه پژوهش‌گران قرار گرفته‌است (۷، ۸). چرا که در طول قرن آینده، این تغییرات عواقب قابل توجهی در ساختار و عمل کرد اکوسیستم‌های دریایی و هم‌چنین کارکردهای آن مانند تولید اکسیژن و ذخیره کربن آنتروپوژنیک خواهد داشت (۹، ۱۰). چندین فعالیت پژوهشی، تغییرات آینده موجودات دریایی را در مقیاس اکوسیستم‌های بزرگ دریایی، حوضه‌های ساحلی و اقیانوسی پیش‌بینی کرده‌اند، اما هنوز چگونگی اعمال این تغییرات محیطی در حوضه‌های مختلف اقیانوسی به‌طور جامع بررسی نشده است (۵، ۱۵-۱۱).

یکی از این حوضه‌ها، حوضچه‌های جزر و مدی هستند که به‌عنوان یک اکوسیستم با شرایط سخت در نظر گرفته می‌شوند و در آن بسیاری از تهدیدات طبیعی برای موجودات زنده از جمله دمای شدید وجود دارد. حوضچه‌های جزر و مدی مشخصه سواحل صخره‌ای هستند که در هنگام جزر و مد، مقداری از آب دریا در آن‌ها باقی می‌ماند (۱۶، ۱۷). با افزایش دمای آب به‌دنبال گرم شدن کره زمین، دمای حوضچه‌های جزر و مدی نیز افزایش می‌یابد و بنابراین موجودات ساکن این حوضچه‌ها را وادار می‌کند تا خود را با چنین تغییراتی وفق دهند. این افزایش دما هم‌چنین می‌تواند بر توانایی زنده ماندن موجودات آبی، به‌ویژه موجوداتی که در آب‌های کم‌عمقی هم‌چون حوضچه‌های جزر و مدی زندگی می‌کنند، تأثیر گذاشته و منجر به اختلال در فعالیت‌های متابولیسمی حیوانات و گیاهان این مناطق شده که در شرایط حاد می‌تواند حتی باعث مرگ این موجودات شود (۱۸).

گرم شدن کره زمین و در پی آن نوسانات دمایی بالا در حوضچه‌های جزر و مدی همان‌طور که گفته شد قادر است ساختار جوامع زیستی در امتداد ساحل، به‌ویژه در حوضچه‌های جزر و مدی را تحت تأثیر قرار دهد و بنابراین، مطالعه و پژوهش‌هایی در مورد واکنش و رفتار فیزیولوژیکی موجوداتی که در چنین مکان‌هایی زندگی می‌کنند مورد نیاز است تا سازگاری با تنش‌های گرمایی آینده را بتوان بررسی کرد. علاوه بر این، چنین مطالعاتی قادر خواهند بود اطلاعات مفیدی در مورد درک تغییرات زیست محیطی ناشی از تغییرات آب و هوایی ارائه دهند (۱۸).

خارپوستان از جمله موجودات دریایی فراوان و موفق از نظر اکولوژیکی هستند (۱۹، ۲۰) و یکی از گروه‌های کلیدی، که احتمال می‌رود به‌شدت تحت تأثیر تغییرات ناشی از گرمایش جهانی قرار گیرند. مارسانان با ۲۰۶۴ گونه‌ی شناخته شده، بزرگ‌ترین گروه از خارپوستان هستند (۲۱) که در تمامی اقیانوس‌ها از مناطق جذر و مدی گرفته تا اعماق اقیانوس‌ها یافت می‌شوند. اغلب گونه‌ها در بستر و درون شکاف‌ها و حفرات بستر، سنگ‌ها و مرجان‌ها زندگی می‌کنند و برخی دیگر نیز هم‌زیست موجودات مختلفی از جمله مرجان‌ها، توتیاها، دریایی و غیره می‌شوند (۲۲، ۲۳). مارسانان از جمله گروه‌های غالب در

حوضچه‌های جذر و مدی هستند که به شدت تحت تأثیر نوسانات دمایی می‌باشند و احتمال می‌رود که این نوسانات بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژیک و زندگی این موجودات تأثیر بگذارد (۱۸).

یکی از چشم‌گیرترین خصوصیات مارسانان و به‌طور کلی خارپوستان، پتانسیل بازسازی چشم‌گیر آن‌هاست که بیش‌ترین میزانی است که تاکنون گزارش شده و در تمام مراحل زندگی (مراحل رویانی، لاروی و بالغ) دیده می‌شود و به‌طور گسترده‌ای برای احیای بخش‌های بدن و حتی ساخت موجود جدید از قطعه‌های باقیمانده‌ی بدنی از طریق فرآیندهای تقسیم و تکثیر سلولی و فرآیندهای مشابه به‌کار گرفته می‌شود (۲۴). طیف گسترده‌ی بازسازی در آن‌ها، شانس بقای موجود و شرایط ضروری برای تقسیمات و ایجاد قطعاتی که به آن‌ها اجازه‌ی ایجاد سریع کلنی‌هایی متناسب با شرایط محیطی منطقه جدید را می‌دهد، فراهم کرده است. از این‌رو، باتوجه به شواهد استراتژیکی، بازسازی به‌طور قطع به‌سازگاری گونه‌ها و هم‌چنین موفقیت و بقای خارپوستان در اکوسیستم‌های دریایی کمک کرده است (۲۵). بنابراین ستاره‌های شکننده به‌عنوان یکی از گونه‌های غالب در مناطق جذر و مدی سواحل صخره‌ای می‌توانند مدل‌های آزمایشگاهی مناسبی برای بررسی اثرات تغییرات پارامترهای فیزیوشیمیایی باشند (۲۶).

از این‌رو در این پژوهش، تأثیرات افزایش دما بر توانایی بازسازی ستاره شکننده از گونه‌ی *Ophiocoma scolopendrina* که گونه‌ی غالب در مناطق جذر و مدی سواحل جنوبی جزیره قشم است (۲۸)، بررسی شد. چرا که در خلیج فارس، با توجه به خصوصیات منحصر به‌فردش، به‌ویژه شرایط حساس محیطی آن و دخالت‌های انسانی، گونه‌ها به‌محدوده‌ی تحمل محیطی خود نزدیک هستند (۲۷)، بنابراین کوچکترین تغییرات و نوسانات آب و هوایی می‌تواند پیامدهای قابل توجهی برای اکوسیستم‌های دریایی خلیج فارس و موجودات آن داشته باشد (۳۱-۲۹). به‌همین خاطر چنین مدلی می‌تواند اطلاعات مفیدی را در راستای تغییرات زیستی ناشی از گرمایش جهانی و پیش‌بینی آینده‌ی احتمالی موجودات ساکن چنین مناطقی به‌دست دهد.

## مواد و روش‌ها

مرحله‌ی نمونه‌برداری این پژوهش، با مجوز و زیر نظر اداره محیط زیست منطقه‌ی آزاد قشم انجام شد. نمونه‌های بالغ ستاره‌ی شکننده در مهرماه ۱۳۹۷ در زمان جذر کامل، از منطقه جذر و مدی ساحل جنوب شرقی جزیره قشم (شکل ۱- الف) جمع‌آوری شدند، تنها ستاره‌های شکننده‌ای برای روند آزمایش انتخاب می‌شدند که بازوها و دیسکی سالم داشتند، میانگین اندازه دیسک‌ها  $13/13 \pm 13/75$  میلی‌متر بود. نمونه‌ها بلافاصله درون سطل‌های پلاستیکی به‌آزمایشگاه زیست دریا واقع در دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه هرمزگان، منتقل شدند و به‌تشت‌هایی حاوی آب دریای تازه و دارای هواده‌ی منتقل شدند تا مرحله‌ی سازگاری را پشت سر بگذارند (شکل ۱- ب). در این بازه‌ی زمانی به‌طور مرتب خصوصیات فیزیکی-شیمیایی آب چک شد، هر دو روز یک‌بار آب تشت‌ها سیفون شده و با آب دریای تازه جایگزین می‌شد و دو بار در هفته نیز نمونه‌ها با رژیم غذایی *Microvore microdiet* (سوسپانسیون از برند آمریکایی *Brightwell Aquatics*) تغذیه می‌شدند (۳۲).



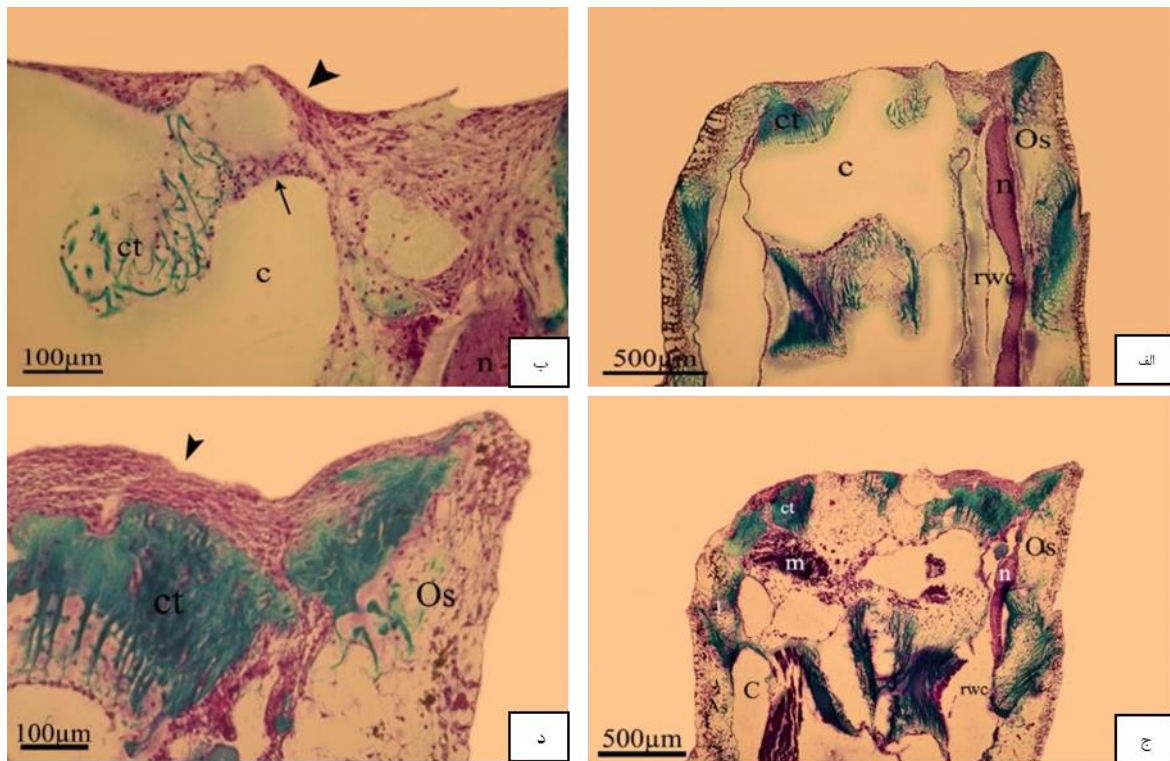
شکل ۱: الف) منطقه نمونه برداری با مختصات جغرافیایی:  $26^{\circ}55'31.23''N$ ,  $56^{\circ}14'18.71''E$ ؛ ب) نمونه‌های ستاره شکننده *O. scolopendrina* در تشت‌های آداپتاسیون.

پس از طی بازه‌ی آداپتاسیون، ستاره‌های شکننده به کمک محلول ۳/۵ درصد  $MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$  و طبق پروتوکول بی‌حس شدند. سپس از هر ستاره‌ی شکننده ماکزیمم دو بازو با فاصله‌ی ۶-۷ سانتی متر از دیسک به کمک اسکالپل قطع شد (۳۲ و ۳۳). سپس ستاره‌های شکننده‌ای که دچار قطع عضو شده بودند، به ۶ دسته تقسیم شدند: سه آکواریوم برای نمونه‌های شاهد (با آبی هم‌دمای محیط (مشابه شرایط آداپتاسیون: ۲۵ درجه سانتی‌گراد)) و سه آکواریوم با اختلاف دمایی ۷ درجه سانتی‌گراد بیش‌تر از آکواریوم‌های شاهد (۳۲ درجه سانتی‌گراد) مهیا شد. آکواریوم‌ها در سایر ویژگی‌ها و شرایط محیطی (شوری ppt ۴۰ و دوره نوری ۱۲ ساعته) شرایط مشابهی داشتند. ستاره‌های هر دسته بلافاصله پس از قطع عضو به آکواریوم-هایشان منتقل شدند. سپس از بازوهای قطع شده‌ی ستاره‌های موجود در آکواریوم‌ها در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت، ۱۴ روز و ۲۱ روز پس از نخستین برش بازو، مجدداً برش گرفته شد (۳۲). نمونه‌ها سپس در محلول بوئین به مدت ۴۸ ساعت فیکس شده و به مدت ۵ روز با TCA کلسیم زدایی شدند. سرانجام پس از آب‌گیری در دستگاه پاساژ بافتی، از نمونه‌ها بلوک-های پارافینی و از آن‌ها برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرومتر تهیه شد (۳۴). در نهایت لام‌های آماده شده از مرحله قبل، با روش Milligan Trichrome (1946) رنگ‌آمیزی و برای بررسی توسط میکروسکوپ نوری آماده شدند.

## نتایج

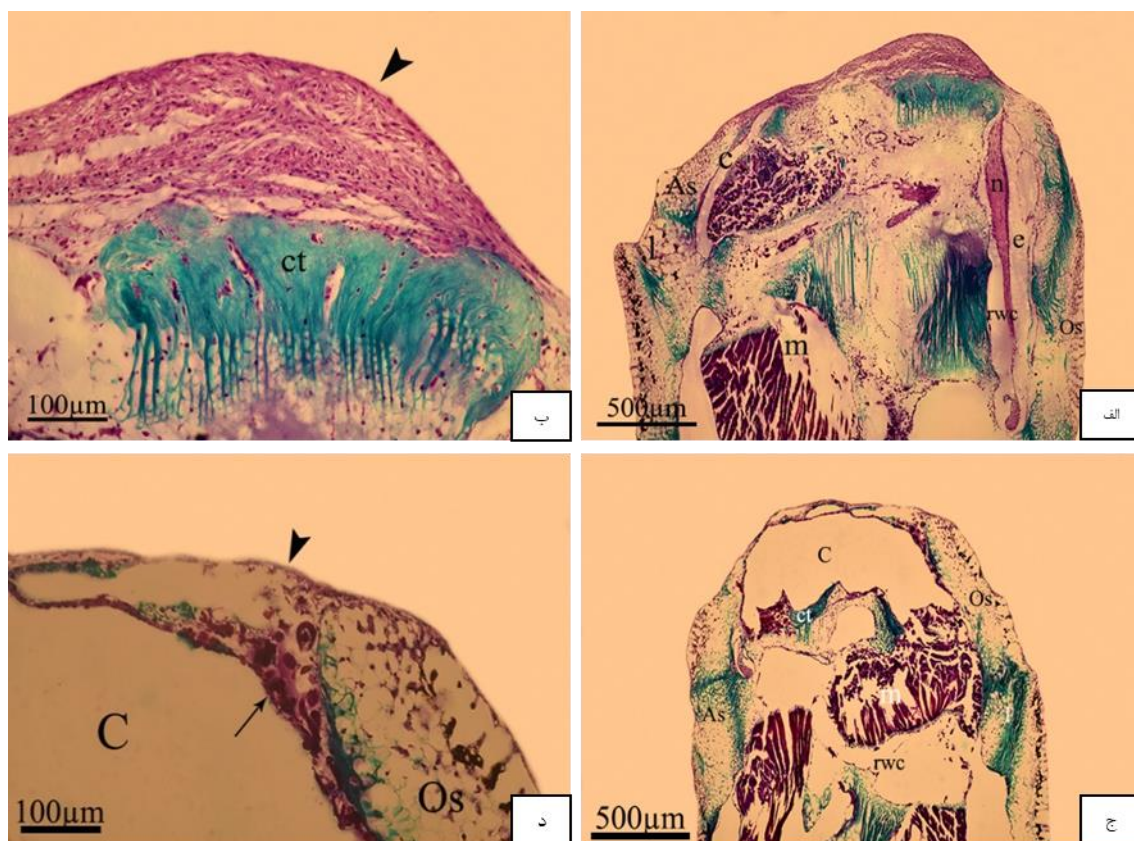
مشاهدات ما حاکی از آن بود که در نمونه‌های شاهد، در برش‌های Sagittal پس از ۲۴ ساعت، لایه‌ی نازک سلولی، بخش مقعر برش خورده‌ی بازو را پوشانیده است، این لایه احتمالاً از توسعه‌ی اپیدرم خارجی بازو و از طریق مهاجرت سلول‌ها شکل گرفته است. این پروسه به علت پراکندگی سلول‌ها در استرومای بافت پیوندی، پروسه‌ای ناتمام به نظر می‌رسد (شکل ۲-ب). از طرفی انتهای حفره‌ی سلومیک و کانال‌های آبی کاملاً بسته شده که به نظر می‌رسد این سلول‌های مهاجر و همین‌طور انقباضات محتوای ماهیچه‌ای دیواره‌ی سلومیک در این امر نقش داشته‌اند. از سوی دیگر RNC را می‌بینیم که نسبت به سطح برش به عقب کشیده شده است (شکل ۲-الف). گروه زیادی از سلول‌ها که احتمالاً از فاگوسیت‌ها و سلول‌های کوچک تمایز نیافته‌ی سلوموسیت باشند در مجاورت طناب عصبی و کانال آبی و ساختارهای سلومیکی قابل مشاهده‌اند. سلول‌های سرگردان و پراکنده‌ی فاگوسیت و سلوموسیت نیز در حفره‌ی کانال آبی به چشم می‌خورند.

از طرفی در نمونه‌های تیمار استرس دمایی تمام آن‌چه در خصوص نمونه‌های شاهد طی ۲۴ ساعت رخ داده بود قابل مشاهده بودند اما در فاز بالاتری، به‌گونه‌ای که لایه‌ی پوشاننده‌ای که از توسعه اپیدرم خارجی و مهاجرت سلول‌ها شکل گرفته بود به مراتب ضخیم‌تر بوده و به صورت چندین لایه بافت پیوندی را دربر گرفته بودند (شکل ۲-د)، مشاهداتی که با فاز ۷۲ ساعت در نمونه‌های شاهد قابل قیاس بود. از طرفی هم‌چنان پراکندگی سلول‌های مهاجر در استرومای بافت پیوندی به‌وضوح آشکار است که شواهدی بر عدم اتمام این پروسه است. RNC عقب کشیده شده از سمت جراحی و گروه‌های سلولی متشکل از فاگوسیت‌ها و سلول‌های سلوموسیت نیز در مجاورت طناب عصبی و کانال آبی در نمونه‌های تیمار استرس دمایی دیده شدند (شکل ۲-ج).



شکل ۲: مقطع sagittal از بازوی ستاره‌ی شکننده *O. scolopendrina* زیر میکروسکوپ نوری (LM). الف و ب) نمونه‌های شاهد 24 h p.a.؛ ج و د) نمونه‌های تیمار استرس دمایی 24 h p.a.؛ سرفلش در شکل ب و د نشان‌دهنده‌ی لایه نازک سلولی تشکیل شده در محل قطع بازو و فلش نشان‌دهنده‌ی سلول‌های مهاجر و سلوموسیت‌ها. (connective tissue) ct؛ بافت پیوندی؛ c (main coelomic cavity)؛ حفره‌ی سلومیک اصلی؛ n (radial nerve)؛ عصب شعاعی؛ rwc (radial water canal)؛ کانال آبی شعاعی؛ Os (Oral arm shield)؛ صفحات دهانی بازو؛ رنگ آمیزی به روش (Milligan Trichrome (1946).

در برش‌های ۷۲ ساعت، ضخامت لایه‌ی سلولی که در نمونه‌های شاهد بخش برش‌خورده‌ی بازو را پوشانده افزایش یافته است (شکل ۳-ب)، اما همچنان گسستگی این لایه و سلول‌های پراکنده در استرومای بافت پیوندی که از زیر لایه، آن را حمایت می‌کند حکایت از ناتمام بودن فرآیند دارد (آنچه در نمونه‌های ۲۴ ساعته‌ی برش‌های تیمار استرس دمایی قابل مشاهده بود). در این سطح مقطع، ماهیچه‌های بین مهره‌ای نیز قابل رویتند. RNC همراه با تجمعات سلول‌های سلوموسیتی اطراف آن نیز در سطح مقطع گرفته شده کاملاً مشخص است (شکل ۳-الف). این در حالیست که آنچه در نمونه‌های تیمار استرس دمایی بازه‌ی ۷۲ ساعت کاملاً عیان است حفره‌های سلومیک در حال توسعه هستند (شکل ۳-د)؛ به گونه‌ای که حفره‌های سلومیک کاملاً متمایز از یکدیگر، ساختاری توخالی هایپرتروفیک را از خود بروز می‌دهند. از طرفی سلوموسیت‌ها، فاگوسیت‌ها و میوسیت‌های تمایززدایی شده نیز در مقاطع گرفته شده از این بازه‌ی زمانی قابل رویتند (شکل ۳-ج).



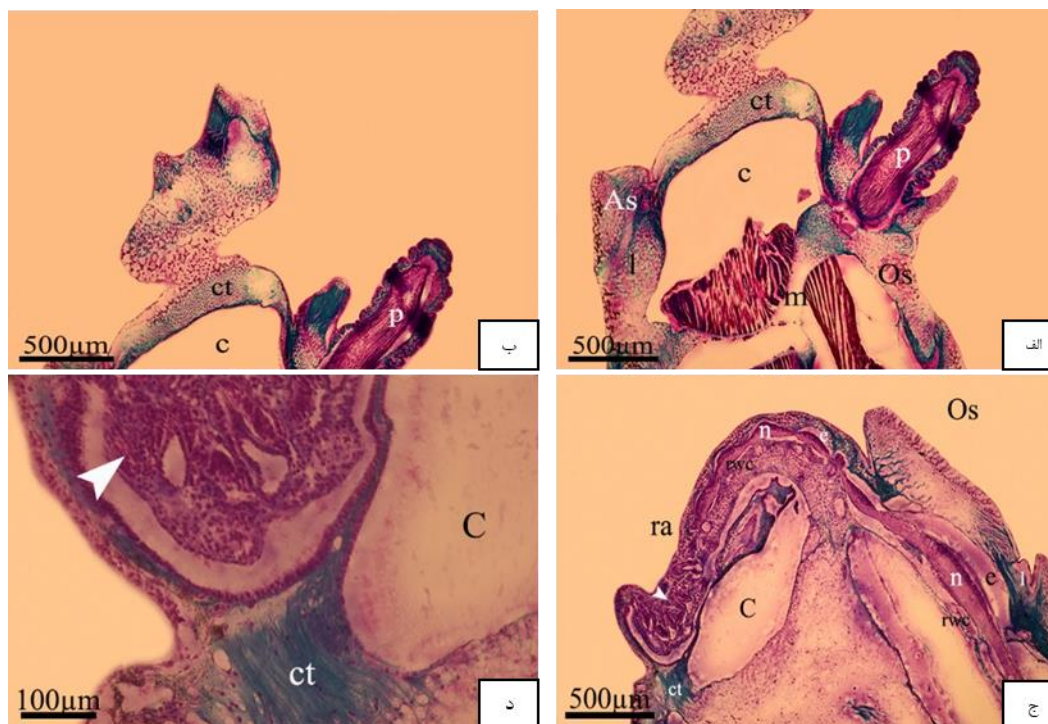
شکل ۳: مقاطع طولی از بازوی ستاره شکننده *O. scolopendrina*. الف و ب) نمونه‌های شاهد 72 h p.a.؛ ج و د) نمونه‌های تیمار استرس دمایی 72 h p.a.؛ سرفلش نشان‌دهنده لایه پوشاننده محل قطع بازو که در نمونه‌های شاهد ضخیم‌تر و چندلایه‌ای شده است آنچه در نمونه‌های تیمار استرس دمایی ۲۴ ساعته رخ داده بود و فلش نشان‌دهنده سلول‌های مهاجر و سلوموسیت‌ها. (connective tissue) ct: بافت پیوندی؛ c (main coelomic cavity): حفره سلومیک اصلی؛ n (radial nerve): عصب شعاعی؛ rwc (radial water canal): کانال آبی شعاعی؛ e (epineural sinus): سینوس اپی‌نورال؛ Os (Oral arm shield): صفحات دهانی بازو؛ As (Aboral arm shield): صفحات مقابل دهانی بازو؛ l (ligaments): رباط‌ها؛ m (intervertebral muscles): ماهیچه‌های بین‌مهره‌ای؛ رنگ‌آمیزی به روش (Milligan Trichrome (1946)

از این بازوی زمانی به بعد، تا ۶ روز پس از قطع بازو همه چیز به نظر عادی می‌رسید تا این که متوجه رفتار عجیب ستاره‌های آکواریوم‌های تیمار استرس دمایی شدیم، ستاره‌های شکننده‌ای که در حالت نرمال به صورت تجمعی و در زیر سنگ‌ها می‌خزیدند، به صورت منفرد و در گوشه کنار آکواریوم به چشم می‌خوردند در حالی که بازوهایشان پیچ و تاب خورده بود برخلاف حالت نرمال که بازوها کشیده است و برای دریافت غذا و حرکت آن‌ها را در حالت گسترده قرار می‌دادند (شکل ۴- الف). از طرفی ریخته شدن اسیکل‌ها مورد دیگری بود که در این ستاره‌های تیمار استرس دمایی جلب توجه می‌کرد (شکل ۴- ب).



شکل ۴: الف) ستاره‌های شکننده *O. scolopendrina* تیمار استرس دمایی که به صورت منفرد در آکواریوم پراکنده‌اند. ب) سر فلش، اسپیکل‌های ریخته شده از بازوی ستاره شکننده *O. scolopendrina* را در زیر استریومیکروسکوپ نشان می‌دهد.

در نمونه‌های شاهد حاصل از بازوی زمانی ۱۴ روز پس از قطع بازو، توسعه‌ی شدید حفره‌ی سلومیک دیده می‌شود و دسته‌ی وسیعی از سلول‌های مهاجر و پراکنده در بافت پیوندی که در حال فاصله گرفتن از لایه‌ی ضخیمی از سلول‌هایی هستند که در ابتدا بخش قطع شده‌ی بازو را پوشانده بودند (شکل ۵-الف). در این مرحله، رشد بلاستمای بازسازی شده واضح‌تر از نمونه‌های مرحله‌ی قبل است و می‌توان تجمع سلوموسیت‌ها، فاگوسیت‌ها و میوسیت‌های تمایزدایی شده را مشاهده کرد، از طرفی پودیاها نیز در حال توسعه هستند. این در حالی است که مشاهده مقطع sagittal نمونه‌های تیمار استرس دمایی باعث شگفتی شدند. در ستاره‌های شکننده‌ای که تا این بازوی زمانی استرس دمایی را تحمل کرده بودند اگرچه ساختار پودیا و اسپیکل‌ها مشاهده نمی‌شد و عملاً اسپیکل‌های خود را از دست داده بودند اما وجود بازوی مینیاتوری کوچکی با ساختار عصبی گانگلیونی در زیر اپیدرم پوشاننده‌ی محل جراحی شگفت زده‌مان کرد، اگرچه انتظار می‌رفت با افزایش دما با افزایش سرعت ترمیم روبه‌رو باشیم اما مشاهده ساختار ترمیم شده آن‌هم در زیر اپیدرم پوشاننده امری عجیب بود. در این بازوی مینیاتوری، به‌طور کلی ساختار سری گانگلیونی طناب عصبی بازسازی شده به‌وضوح در بخش بازسازی شده مشخص است (شکل ۵-ج). حفره‌ی سلومیک اصلی و کانال‌های سلومیکی مشتق شده از آن هم‌چون کانال آبی شعاعی، هیپونئورال سینوس و اپی‌نئورال سینوس به‌خوبی توسعه یافته‌اند (شکل ۵-د). سلوموسیت‌های تمایز نیافته، فاگوسیت‌ها و میوسیت‌های تمایزدایی شده هم‌چنان به‌طور پراکنده در کانال‌های سلومیکی جدید قابل رویتند. بلاستما ساختاری ناهم‌گون و چندلایه‌ای به‌خود گرفته‌است و در بخش داخلی آن، سلول‌های بلاستمایی درون یک ماتریکس رشته‌ای اطراف کانال‌های سلومیکی و RNC را احاطه کرده‌اند. در بخش راسی و نوک بلاستمای بازسازی شده، این سلول‌ها در لایه‌های متراکمی طبقه‌بندی شده‌اند و حدفاصل این دو بخش سلولی توسط مزانشیمی سست و فاقد سلول پر شده‌اند (شکل ۵-د). از طرفی اتصال نوک بازوی مینیاتوری به‌بخش قدیمی بازوی ستاره شکننده به‌کمک بافت پیوندی در زیر میکروسکوپ به‌وضوح مشهود بود (شکل ۵-د).



شکل ۵: الف و ب) نمونه‌های شاهد ستاره شکننده *O. scolopendrina* در ۱۴ امین روز پس از قطع بازو؛ ج و د) نمونه‌های تیمار استرس دمایی پس از ۱۴ روز؛ سر فلش نشان‌دهنده‌ی تجمع سلول‌ها در بلاستمای بازسازی شده. (connective tissue) ct) بافت پیوندی؛ c (main coelomic cavity): حفره‌ی سلومیک اصلی؛ (Oral arm shield) Os: عصب شعاعی؛ (radial nerve) n: کانال آبی شعاعی؛ e (epineural sinus): سینوس اپی‌نئورال؛ (Aboral arm shield) As: صفحات دهانی بازو؛ (intervertebral muscles) m: ماهیچه‌های بین‌مهره‌ای؛ (vertebra) v: مهره؛ p (podia): پودیا؛ ra (regenerating arm): بازوی در حال بازسازی؛ رنگ آمیزی به روش (1946) Milligan Trichrome.

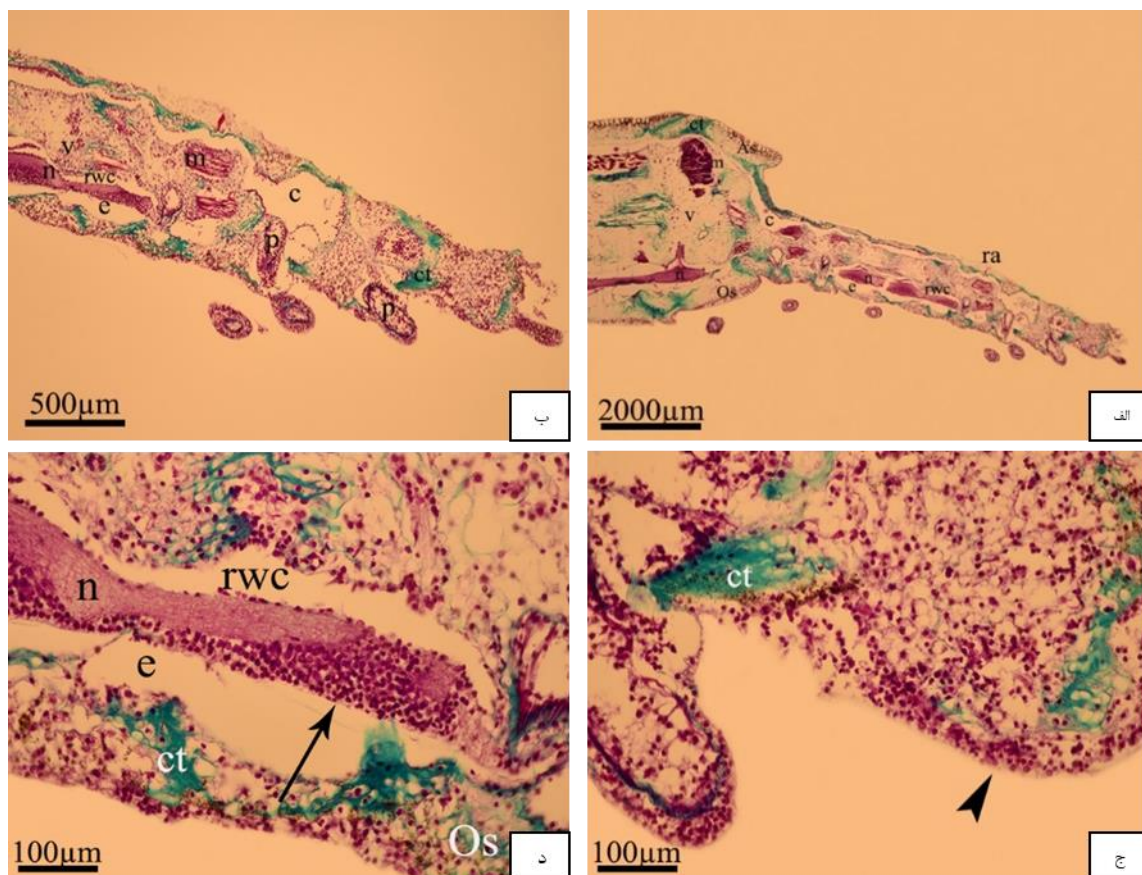
از این بازه زمانی به بعد، هر چه پروسه آزمایش بیشتر پیش می‌رفت نمونه‌های تیمار استرس دمایی با آسیب دیسک و قطعه شدن بازو به این افزایش دمایی طولانی مدت پاسخ می‌دادند (شکل ۶). به گونه‌ای که تا روز ۲۱ ام پس از قطع بازو، هیچ ستاره‌ی شکننده‌ای از آکواریوم‌های تیمار استرس دمایی باقی نمانده بود. این در حالی است که نمونه‌های شاهد هم‌چنان تا پایان پروسه آزمایش به ترمیم و بازسازی خود ادامه دادند.



شکل ۶: نمونه‌های تیمار استرس دمایی ستاره شکننده *O. scolopendrina* پس از گذشت ۱۸ روز از شروع آزمایش.

اما وضع ترمیم و بازسازی در نمونه‌های شاهد در بیست و یکمین روز از قطع بازو از این قرار بود: بلاستمای بازسازی شده، ساختارهای بافتی و الگوی شکل‌گیری آن‌ها و تمایز بافتی قابل رویت است (شکل ۷-الف). محتوای عصبی و سلومیک به وضوح در جوانه‌ی بازسازی شده از بازو با ویژگی‌های آناتومیک و بافت شناسی خود قابل مشاهده‌اند. به طور کلی RNC بازسازی شده الگوی گانگلیونی از خود بروز می‌دهد، این در حالی است که بخش‌های سلومیک و کانال آبی شعاعی کاملاً متمایز از یکدیگر،

ساختاری توخالی/هایپرτροφیک را از خود بروز می‌دهند (شکل ۷-ب). تجمع زیادی از سلول‌های مهاجر (عمدتاً سلوموسیت‌ها)، فاگوسیت‌ها و میوسیت‌های تمایززدایی شده که غالباً درون حفره‌های سلومیکی قابل رؤیت بودند، به‌طور عمده، در انتهای در حال بازسازی بازو دیده می‌شوند (شکل ۷-ج). ساختار بلاستمایی نسبتاً ناهم‌گون به‌نظر می‌رسد. ساختار پودیه‌های جدید نیز در این مرحله قابل مشاهده است و بازوی مینیاتوری بازسازی شده در حال توسعه است.



شکل ۷: مقاطع طولی از بازوی ستاره شکننده نمونه‌های شاهد *O. scolopendrina* پس از ۲۱ روز؛ فلش نشان‌دهنده‌ی تجمع فاگوسیت‌ها و سلول‌های کوچک تمایزنیافته‌ی سلوموسیت در ارتباط نزدیک با RNC و فلش نشان‌دهنده‌ی تجمع فراوانی از سلول‌های مهاجر در راس بازوی بازسازی شده در بلاستما. (ct) (connective tissue): بافت پیوندی؛ c (main coelomic cavity): حفره‌ی سلومیک اصلی؛ n (radial nerve): عصب شعاعی؛ rwc (radial water canal): کانال آبی شعاعی؛ e (epineural sinus): سینوس اپی‌نئورال؛ Os (Oral arm shield): صفحات دهانی بازو؛ As (Aboral arm shield): صفحات مقابل دهانی بازو؛ l (ligaments): رباط‌ها؛ m (intervertebral muscles): ماهیچه‌های بین‌مهره‌ای؛ v (vertebra): مهره؛ p (podia): پودیا؛ ra (regenerating arm): بازوی در حال بازسازی؛ رنگ آمیزی به روش Milligan Trichrome (1946).

### بحث

با بررسی مقاطع sagittal و para-sagittal در نمونه‌های شاهد ستاره شکننده *O. scolopendrina*، مشخص شد که در همان ساعت‌های اولیه، ستاره‌های شکننده به از دست دادن بخشی از بازو واکنش نشان دادند، آن‌ها با انقباض ماهیچه‌های دیواره‌ی سلومیک و خم کردن صفحات دهانی و مقابل دهانی، حفره‌های سلومیکی و کانال آبی شعاعی و حفره‌ی سلومیک مقابل دهانی را مسدود کردند و با این کار مانع از هدر رفت مایع سلومیکی شدند. هم‌زمان با اولین واکنش‌ها، همان‌گونه که پیش از این Czarkwiani و همکاران (۲۶) نیز تایید کرده بودند، در ۲۴ ساعت اول پس از قطع بازو، ترمیم محل آسیب به کمک سلول‌های مهاجر از سلول‌های اپیدرمی بخش باقیمانده‌ی بازو صورت گرفت؛ که در شکل ۲-ب تشکیل لایه‌ی ظریف و نازکی از این سلول‌ها که محل برش را پوشانده‌اند، می‌توان مشاهده کرد. مشاهدات این قسمت با مشاهدات Biressi و

همکاران (۳۵) در خصوص ستاره‌ی شکننده‌ی *Amphiura filiformis* مطابقت دارد، اما سریع‌تر از آن‌چه در مورد *Ophioderma longicaudum* مشاهده کردند می‌باشد، که می‌توان علت آن را دمای آب آکواریوم‌های نمونه دانست، دمای آزمایشی ما ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد اما دمای آزمایش طراحی شده توسط آن‌ها ۱۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بود.

پس از گذشت ۷۲ ساعت، ضخامت لایه‌ی ایجاد شده توسط سلول‌های مهاجر به حدی می‌رسد که با نمونه‌های روز هفتم *O. longicaudum* از آزمایش Biressi و همکاران (۳۵) قابل قیاس است، احتمال این که جدای از اختلاف دمای آزمایش‌ها، سرعت ترمیم در گونه‌ی *O. scolopendrina* بیشتر باشد نیز وجود دارد. در این مرحله مطابق گفته‌های Czarkwiani و همکاران (۲۶) و نیز Ferrario و همکاران (۳۲)، در حین اپی‌تلیالیزاسیون مجدد، لایه‌ای از سلول‌های مهاجر و سلوموسیت‌ها را پراکنده در بافت پیوندی زیر لایه‌ی ایجاد شده و نیز به صورت پراکنده در حفره‌های سلومیکی توانستیم مشاهده کنیم (شکل ۳- الف و ب)، از طرفی ناهمگن بودن لایه‌ی پوشاننده‌ی محل جراحی، همان‌گونه بود که Biressi و همکاران (۳۵) شرح داده بودند و نشانه‌ای از عدم اتمام اپی‌تلیالیزاسیون مجدد به‌شمار می‌رفت. علاوه بر آن، در این مرحله همان‌گونه که Ferrario و همکاران (۳۲) نیز اشاره کرده بودند، می‌توانستیم نشانه‌هایی را از هیستولیز و بازآرایی بافت‌های آسیب‌دیده، به‌خصوص در پیوندهای بین ماهیچه‌های بین‌مهره‌ای حاضر در زیر لایه‌ی تشکیل شده مشاهده کنیم (شکل ۳- الف و ب).

در هفته‌ی دوم، تغییرات برجسته‌ی ساختار بازو شامل توسعه‌ی گسترده‌ی حفره‌ی سلومیکی و توسعه‌ی پودیه‌هاست. ساختار بلاستمایی بازسازی شده در راس منطقه‌ی ترمیم شده در این مرحله در حال توسعه و فاصله گرفتن از بازوست و پراکنش سلوموسیت‌ها در بافت پیوندی محل برش به‌وضوح قابل مشاهده است (شکل ۵- الف و ب). مشاهدات این مرحله و مرحله‌ی قبل با مشاهدات Biressi و همکاران (۳۵) در مراحل آزمایش *A. filiformis* هم‌خوانی دارد.

بازوی مینیاتوری ساخته شده در هفته‌ی سوم، بازویی است که به‌روشنی تمایزات بافتی و ویژگی‌های آناتومیکی یک بازوی معمولی از ستاره‌ی شکننده را به‌نمایش می‌گذارد، در این فاز تمامی کانال‌ها و حفره‌های سلومیکی، از کانال آبی شعاعی گرفته تا کانال اپی‌نئورال سینوسی و کانال سلومیکی اصلی به‌خوبی قابل تشخیص‌اند و از هم تمییز داده می‌شوند. ساختار بلاستمایی و تراکم سلول‌های آن در راس بازوی ترمیم شده به‌روشنی مشخص است (شکل ۷- ج). طناب عصبی با ساختار گانگلیونی خود در امتداد بازوی مینیاتوری ساخته شده به‌چشم می‌خورد؛ از طرفی تراکم بالای سلول‌های عصبی و سلوموسیت‌هایی که در ارتباط نزدیک با ساختار عصبی هستند نیز دیده می‌شود (شکل ۷- د). در شکل ۷- الف می‌توان بازآرایی مجدد رشته‌های ماهیچه‌ای بین‌مهره‌ای در بخش قدیمی بازو را نیز مشاهده کرد. تمامی نتایج حاصل با نتایج حاصل از کارهای Biressi و همکاران بر روی گونه‌ی *A. filiformis* و کار Ferrario و همکاران (۲۳) (مطابقت داشت حتی به‌نظر می‌رسد ساینز بازوی مینیاتوری ساخته شده در گونه‌ی *O. scolopendrina* بیش‌تر از گونه‌ی تحت آزمایش آن‌هاست اما به‌دلیل اختلاف دمای شرایط آزمایشی نمی‌توان چنین نتیجه‌ای را با قطعیت عنوان کرد.

اما آن‌چه که در نمونه‌های تیمار استرس دمایی مشاهده شد، سرعت بیش‌تر فرآیندهای ترمیم و بازسازی بود به‌گونه‌ای که بازوی مینیاتوری با ساختار عصبی گانگلیونی در روز ۱۴ ام پس از قطع بازو به‌طور کامل شکل گرفته است. امری که به‌علت افزایش سرعت متابولیسمی تحت تاثیر افزایش دما با توجه به‌داده‌های حاصل از آزمایش Pribadi و همکاران (۱۸) چندان هم دور از انتظار نبود اما نتیجه خاص و ویژه‌ای که این مطالعه را از سایر پژوهش‌های مشابه متمایز می‌کند، این بود که در دمای آزمایش طراحی شده و پس از گذشت این بازه زمانی، بازوی مینیاتوری در زیر سطح اپیدرم پوشاننده تشکیل شده بود و ساختار بلاستمایی نوک بازو کاملاً متصل به بافت پیوندی ساقه‌ی بازوی قدیمی بود. چیزی که پیش از این کار پژوهشی، گزارش نشده بود. احتمالات ممکن برای چنین ساختار بافتی‌ای شاید این باشد که تحت فشار عامل استرس‌زای افزایش دما،

موجود بازوی مینیاتوری آسیب‌پذیر و شکننده را زیر پوشش سلول‌های اپیدرمی محفوظ نگه می‌دارد تا با بهتر شدن شرایط محیطی بتواند رفته رفته این ارتباط را از بین برده و بازوی مینیاتوری را به کار گیرد.

#### نتیجه‌گیری

نمونه‌های تیمار استرس دمایی، به علت افزایش سرعت متابولیسمی ناشی از افزایش دما، سرعت بیش‌تری در فرآیندهای ترمیم و بازسازی داشتند؛ از طرفی رفتارهای نمونه‌های تیمار استرس دمایی منطبق بر پیش‌بینی‌ها و نتایج بررسی‌های سایر پژوهش‌گران بود که اعلام کرده بودند در طول آزمایشات، فقط ستاره‌هایی که در معرض استرس دمایی نبودند، حرکات فعال را با فرکانس بالا نشان دادند. ستاره‌های باقیمانده در معرض دما، فعالیت‌های کاهشی همراه با افزایش سطح دما را نشان دادند که نشان دهنده پاسخ بالقوه به استرس است. اگرچه با پیشرفت زمان آزمایش، دیسک ستاره‌ها آسیب دید و پاسخ ستاره‌ها به تحمل طولانی مدت شرایط دمایی نامساعد، قطعه قطعه کردن بازو و اتوتومی بود. که این امر به علت بازه‌ی طولانی‌تر این آزمایش نسبت به مطالعات قبلی تا حدود توجیه‌پذیر است. اما برای درک و فهم بهتر این مکانیسم و چنین احتمالی نیاز به پژوهش‌های بیش‌تر در این زمینه است.

#### منابع

1. Pecl GT, Araújo MB, Bell JD, Blanchard J, et al. (2017). Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being. *Science*. 2017; 355(6332): eaai9214.
2. Worm B, Lotze HK. Marine biodiversity and climate change. Chapter 13 in: Letcher, T. (ed) *Climate and global change: Observed impacts on Planet Earth*. 2nd Edition, Elsevier. 2016; 195-212.
3. Cheng L, Abraham J, Zhu J, Trenberth KE, et al. Record-setting ocean warmth continued in 2019. 2020; 37:137-142.
4. Moore JK, Fu W, Primeau F, Britten GL, et al. Sustained climate warming drives declining marine biological productivity. *Science*. 359(6380): 1139-1143.
5. Wang CJ, Hudson JM, Lassalle G, Whitesel TA. Impacts of a changing climate on native lamprey species: from physiology to ecosystem services. *Journal of Great Lakes Research*. 2021; 1: hal-03353869.
6. Lefort S., Aumont O, Bopp L, Arsouze T, et al. Spatial and body-size dependent response of marine pelagic communities to projected global climate change. *Global change biology*, 2015; 21(1): 154-164.
7. Gattuso JP, Magnan A, Billé R, Cheung WW, et al. (2015). Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO<sub>2</sub> emissions scenarios. *Science*, 349(6243): aac4722.
8. Riebesell U, Gattuso JP. Lessons learned from ocean acidification research. *Nature Climate Change*. 2015; 5(1), 12-14.
9. Vichi M, Manzini E, Fogli PG, Alessandri A, et al. Global and regional ocean carbon uptake and climate change: sensitivity to a substantial mitigation scenario. *Climate dynamics*. 2011; 37(9): 1929-1947.
10. Pörtner, H. O., Karl, D. M., Boyd, P. W., Cheung, W., et al. "Ocean systems." *Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: global and sectoral aspects. contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge University Press, 2014; 411-484.

11. Barange M, Merino G, Blanchard JL, Scholtens J, et al. Impacts of climate change on marine ecosystem production in societies dependent on fisheries. *Nature Climate Change*. 2014; 4(3): 211-216.
12. Blanchard JL, Watson RA, Fulton EA, Cottrell RS, et al. Linked sustainability challenges and trade-offs among fisheries, aquaculture and agriculture. *Nature ecology & evolution*. 2017; 1(9): 1240-1249.
13. Galbraith ED, Carozza DA, Bianchi DA coupled human-Earth model perspective on long-term trends in the global marine fishery. *Nature communications*. (2017); 8(1): 1-7.
14. Rilov G, Mazaris AD, Stelzenmüller V, Helmuth B, et al. Adaptive marine conservation planning in the face of climate change: What can we learn from physiological, ecological and genetic studies?. *Global Ecology and Conservation*. 2019; 17: e00566.
15. Bryndum-Buchholz A, Tittensor DP, Blanchard JL, Cheung WW, et al. Twenty-first-century climate change impacts on marine animal biomass and ecosystem structure across ocean basins. *Global change biology*. 2019; 25(2): 459-472.
16. Pinet PR. *Invitation to oceanography*. Jones & Bartlett Learning. 2019.
17. King Z. *Examining Desert Habitats*. The Rosen Publishing Group, Inc. 2009.
18. Pribadi TDK, Rostami R, Melanie, Ihsan YN. Response to heat stress of brittlestar [*Ophiocoma erinaceus* (Müller & Troschel, 1842)]: Behaviour and respiration. In AIP Conference Proceedings. 2016; 1744(1): 020058
19. Dupont S, Ortega-Martínez O, Thorndyke M. Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology*. (2010); 19(3): 449-462.
20. Micael J, Alves MJ, Costa AC, Jones MB. Exploitation and conservation of echinoderms. In *Oceanography and marine biology*. CRC Press. 2016; 203-220.
21. Stöhr S, O'Hara TD, Thuy B. (2012). Global diversity of brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). *Plos one*. 2012; 7(3): e31940.
22. Stöhr S. *Amphipholis linopneusti* n. sp., a sexually dimorphic amphiuroid brittle star (Echinodermata: Ophiuroidea), epizoic on a spatangoid sea urchin. In *Echinoderms 2000. Proceedings of the 10th International Echinoderm Conference, Dunedin, New Zealand*. Dunedin: Balkema. 2001; 317-322
23. Stöhr SABINE, Boissin E, Chenuil A. Potential cryptic speciation in Mediterranean populations of *Ophioderma* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Zootaxa*. 2009; 2071(2071): 1-20.
24. Candia Carnevali MD. Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning. *Invertebrate Survival Journal*. 2006; 3(1), 64-76.
25. Ben Khadra Y, Sugni M, Ferrario C, Bonasoro F, et al. Regeneration in Stellate Echinoderms: Crinoidea, Asteroidea and Ophiuroidea. In *Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine*. Springer, Cham. 2018; 285-320.
26. Czarkwiani A, Ferrario C, Dylus DV, Sugni M, et al. Skeletal regeneration in the brittle star *Amphiura filiformis*. *Frontiers in zoology*. 2016; 13(1): 18.
27. Im ES, Pal JS, Eltahir EA. Deadly heat waves projected in the densely populated agricultural regions of South Asia. *Science advances*, 2017; 3(8): e1603322.
28. Amini Yekta F, Asgari, M., & Izadi, S. A checklist of Mollusks, crustaceans and echinoderms in intertidal habitats of Qeshm Island in Persian Gulf (along with a list of some other invertebrates in the region). 1st edition. Published by Author. 2015; 126 p.
29. Jones MC, Cheung WW. Multi-model ensemble projections of climate change effects on global marine biodiversity. *ICES Journal of Marine Science*. 2015; 72(3): 741-752.
30. Buchanan JR, Krupp F, Burt JA, Feary DA, et al. Living on the edge: Vulnerability of coral-dependent fishes in the Gulf. *Marine Pollution Bulletin*. 2016; 105(2): 480-488.

31. Petchey OL, McPhearson PT, Casey TM, Morin PJ. Environmental warming alters food-web structure and ecosystem function. *Nature*. 1999; 402(6757): 69-72.
32. Ferrario C, Khadra YB, Czarkwiani A, Zakrzewski A, et al. Fundamental aspects of arm repair phase in two echinoderm models. *Developmental biology*. 2018; 433(2): 297-309.
33. Blowes LM, Egertová M, Liu Y, Davis GR, et al. Body wall structure in the starfish *Asterias rubens*. *Journal of anatomy*. 2017; 231(3): 325-341.
34. Costa PM. The handbook of histopathological practices in aquatic environments (Guide to histology for environmental toxicology). Academic press. 2018; 277p.
35. Biressi ACM, Zou T, Dupont S, Dahlberg C, et al. Wound healing and arm regeneration in *Ophioderma longicaudum* and *Amphiura filiformis* (Ophiuroidea, Echinodermata): comparative morphogenesis and histogenesis. *Zoomorphology*. 2010; 129(1): 1-19.

## Impacts of thermal stress on the histological arm regeneration of brittle star *Ophiocoma scolopendrina* (Lamarck, 1816)

Nowruzi N Ph.D., Amrollahi Biuki N\* Ph.D.

. Department of marine biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandareabas, Iran

\* Email corresponding author: Amrollahi@hormozgan.ac.ir

Received: 15 Aug. 2021

Accepted: 19 Sep. 2021

---

### Abstract

**Aim:** Investigation the effects of thermal stress on the arm regeneration of brittle star *Ophiocoma scolopendrina* and comparing them with samples regenerated in normal temperature.

**Material and Methods:** In this study, brittle star samples of *O. scolopendrina* collected from Qeshm Island were anesthetized with 3.5% MgCl<sub>2</sub>.6 (H<sub>2</sub>O) solution. Two arms were cut from each star. The brittle stars were divided into 6 groups: three aquariums for control samples (25 °C) and three aquariums for thermal treatment samples (32 °C). Then, at 24, 72 hours, 14 and 21 days post amputation, their arms have been amputated again. After fixing and decalcification, the samples were prepared and examined under a light microscope.

**Results:** Histological studies of the regeneration process in thermal-treated samples showed that the rate of regeneration in them up to 14 days is faster than the control samples, but from this period onwards the temperature tolerance was beyond their tolerance and led to autotomy and disk destruction of these brittle stars. On the other hand, one of the interesting results of this research was that brittle stars under heat stress reconstructed their miniature arm under the epidermis covering the wound site, which may be a mechanism to protect the delicate and sensitive reconstructed arm.

**Conclusion:** Due to the increase in metabolic rate, the samples of thermal treatment showed more speed in the repair and regeneration processes, but with the prolongation of the time period, the stars underwent autotomy and perished.

**Keywords:** Brittle star, Climate change, Heat stress, Histological structure, regeneration.