



## Studying the Effect of Short Time Salinity on the Activity of Chloride Cells by Immunohistochemistry and Scanning Electron Microscopy in, *Cyprinus carpio*

Irvani R<sup>a</sup>, Abdi R<sup>a\*</sup>, Peyghan R<sup>b</sup>, Archangi B<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

<sup>b</sup> Department of Clinical Sciences and Excellence Center of Warm Water Fish Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Irvani R, Abdi R, Peyghan Rb, Archangi B. Studying the Effect of Short Time Salinity on the Activity of Chloride Cells by Immunohistochemistry and Scanning Electron Microscopy in, *Cyprinus carpio*. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(2):116-127.

 <https://10.61186/JCT.14.2.116>

### KEYWORDS

Salinity  
*Cyprinus carpio*  
Gill  
Osmoregulation

### ABSTRACT

**Aim:** The main purpose of the recent study was to evaluate gill chloride cells in *Cyprinus carpio* during adaptation to different environmental salinities over a short period.

**Material and Methods:** For this research, *Cyprinus carpio* by an average weight of 41.4±1 g and length of 16.9±1 cm in four groups with three replications was used. The first group as control was located in fresh water and the next three groups respectively were kept in 4 ppt, 8 ppt, and 12 ppt salinity with the exact condition. On 0, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h the second-gill arch with a maximum thickness of 0.5 cm from the left side was prepared and placed in formalin's buffer 10%, glutaraldehyde 2.5% solution, and pH 7.4. Then the standard method of preparing tissue sections was performed and paraffin sections with a thickness of 4-6 microns were prepared and stained with hematoxylin and eosin methods and examined with a light microscope. Also, changes in the structure and number of mitochondrial-rich cells, distribution and dispersion of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase enzyme were studied by scanning electron microscope and immunohistochemical technique.

**Results:** Results showed obvious modifications in the number and distribution of chloride cells in two filament and lamellar positions at different sampling times. The highest number of chloride cells in the filament and lamella, 26.28±1.33; 19.11±1.27 was reported in 12ppt and the lowest number belonged to the control group. The largest size of chloride cells in the filament and lamella, 22.51±1.56; 12.72±1.32 was reported in 12ppt and the lowest size belonged to the control group.

**Conclusion:** The findings of this study showed that *C. carpio* gill chloride cells in the face of

\* Corresponding author. Tel.: : 061-53533321-; Fax: 061-53533321

E-mail address: abdir@kmsu.ac.ir

DOI: : <https://10.61186/JCT/14.2.116>

Received: 11 Mar. 2023; Received in revised form: 3 Jun. 2023; Accepted: 24 Jun. 2023

Original Article

© Author



different salinities in a short period can change the number and size and adapt to the new condition.



## مطالعه تاثیر شوری‌های کوتاه مدت بر فعالیت سلول‌های کلراید ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به روش ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ الکترونی روبشی

راضیه ایروانی<sup>۱</sup>، رحیم عبدی<sup>۱\*</sup>، رحیم پیغان<sup>۲</sup>، بیتا ارچنگی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران  
<sup>۲</sup>گروه علوم درمانگاهی و قطب علمی بهداشت ماهیان گرمابی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> هدف اصلی ارزیابی سلول‌های کلراید آبشش ماهی کپور معمولی در طول سازگاری با شوری‌های مختلف محیطی در یک دوره کوتاه مدت بوده است.</p> <p><b>مواد و روش‌ها:</b> ماهی‌ها با وزن میانگین <math>41/4 \pm 1</math> گرم و طول <math>16/9 \pm 1</math> سانتی‌متر در چهار گروه با سه تکرار استفاده شد. گروه شاهد در آب شیرین و سه گروه در شوری ppt4، ppt8، ppt12 با شرایط یک‌سان نگهداری شدند. در ساعات صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ از کمان آبششی دوم نمونه‌هایی با ضخامت نیم سانتی‌متر تهیه و در فرمالین بافر ۱۰ درصد و محلول گلوکارآلدئید ۲/۵ درصد با <math>pH=7/4</math> قرار داده شدند. روش استاندارد تهیه مقاطع بافتی از جدام و برش‌های پارافینی به ضخامت ۴-۶ میکرون با روش‌های هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شدند. همچنین تغییر ساختار، تعداد سلول‌های غنی از میتوکندری، توزیع و پراکندگی آنزیم <math>Na^+/K^+-ATPase</math> به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی و تکنیک ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفتند.</p> <p><b>نتایج:</b> تغییرات آشکار در تعداد و توزیع سلول‌های کلراید در دو موقعیت لاملائی و فیلامنتی در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان داد. بیش‌ترین تعداد سلول‌های کلراید در فیلامنت و لاملا <math>26/28 \pm 1/33</math>، <math>19/1 \pm 11/27</math> در شوری ppt12 و کم‌ترین مربوط به گروه کنترل بود. بزرگ‌ترین اندازه سلول‌های کلراید در فیلامنت و لاملا، <math>22/51 \pm 1/46</math>، <math>12/72 \pm 1/23</math> در شوری ppt12 و کم‌ترین مربوط به گروه کنترل بود.</p> <p><b>نتیجه‌گیری:</b> سلول‌های کلراید آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با شوری‌های مختلف در مدت زمان کوتاه می‌توانند تعداد و اندازه خود را تغییر داده و با شرایط جدید سازگار شوند.</p>	<p>شوری کپور معمولی آبشش تنظیم اسمزی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۳</p>

### ۱- مقدمه

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی می‌باشد که در بسیاری از مناطق مختلف ایران به‌ویژه در نواحی مختلف خوزستان پرورش داده می‌شود (۱). آبشش‌ها در ماهی نقش‌های مختلفی از جمله تبادل گاز، تنظیم یونی اسید-باز و دفع مواد زائد نیتروژنی را ایفا کرده و برای عملکرد تنظیم اسمزی اختصاصی هستند (۲). در ایپی‌تلیوم

\* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۶۱-۵۳۵۳۳۳۲۱؛ فکس: ۰۶۱۵۳۵۳۳۳۲۱

آدرس پست الکترونیک: [abdir@kmsu.ac.ir](mailto:abdir@kmsu.ac.ir)

آبش سلول های کلراید یا سلول های غنی از میتوکندری یا یونوسیت ها که دارای تراکم بالایی از آنزیم های  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase هستند دارای مهم ترین نقش برای انجام این فرایند می باشند. همه انواع سلول های بافت آبش محل بیان ژن این آنزیم می باشند اما چگالی این آنزیم در سلول های کلراید از دیگر سلول ها بیشتر می باشد. بنابراین مکان یابی این آنزیم با استفاده از آنتی بادی های خاص زیر واحدهای آنزیمی روشی قابل اعتماد برای تشخیص دقیق محل سلول های کلراید می باشد (۳، ۴)، زیرا این سلول های نقش مهمی در تنظیم اسمزی که وظیفه تبادل و دفع یون ها در محیط هیپراسموتیک و جذب یون ها در محیط هیپواسموتیک بر عهده دارند (۵). تنظیم اسمزی چگونگی تنظیم جریان آب در سرتاسر بدن ماهی را روشن می کند که شامل ترکیبی از بافت های بدن، آبش و عمل کرد کلیه هاست. میزان نمک در بافت های بدن ماهی آب شور کمتر از آبی است که در آن زندگی می کنند و محیط شورتر بیرون به طور مداوم آب را از بافت های بدن و پوست ماهی جذب می کند. برای جبران آب از دست رفته و جلوگیری از کم آبی بدن، ماهی آب شور مقدار زیادی از آب شور را می نوشد و ادرار کمی هم تولید می کند. در نقطه مقابل میزان نمک بافت بدن یک ماهی آب شیرین بیشتر از آبی است که در آن زندگی می کند و در نتیجه آب به طور مداوم به بدن ماهی آب شیرین از طریق پوست و آبشش های آن جریان می یابد و ماهی هیچ دلیلی برای نوشیدن آب اضافه ندارد. حتی برای جلوگیری از انباشت آب در بدن ادرار زیادی تولید می کند. به طور کلی، تحمل ماهی کپور و سازگاری با تغییرات شوری محیط بسیار بالاست که به دلیل تغییرات سریع در سلول های غنی از میتوکندری برای تنظیم ورود و خروج آب و الکترولیت ها است (۶). در آبی پروری تغییرات شوری آب یکی از رایج ترین موارد می باشد که می تواند منجر به کاهش تولید و تولید مثل یا مرگ ماهی شود. به طور معمول شوری آب شیرین کمتر از ۱ گرم در لیتر می باشد و ماهیان آب شیرین ممکن است در معرض شوری بالاتر از حد طبیعی قرار گیرند (۷). در سال های اخیر در مزارع پرورش ماهی به دلیل خشک سالی و کاهش بارندگی، شوری آب افزایش یافته است. بنابراین، بررسی اثرات نامطلوب این فرآیند بر روی ماهیان پرورشی ضروری می باشد (۸، ۹). این مطالعه با هدف تعیین تغییرات و سازگاری سلول های کلراید به عنوان یک سلول بسیار مهم در پاسخ به این تغییرات تحت تاثیر شوری های محیطی مختلف در ماهی کپور معمولی انجام شد که به روش بافت شناسی، فراساختاری و مکان یابی آنزیم  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase در بافت اپی تلیال آبشش طی فرآیند سازگاری با روش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی IgG $\alpha$ 5 قابل ردیابی می باشد.

## ۲- مواد و روش ها

### جمع آوری نمونه ها و بافت شناسی معمولی

تمام آزمایش ها بر روی موجود زنده در این تحقیق بر اساس رویه ای که توسط آژانس سلامت حیوانات دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر پذیرفته شده است انجام گرفت. در این مطالعه ماهیان کپور معمولی جوان از هر دو جنس که بر اساس ویژگی های مورفومتری انجام پذیرفت و با میانگین وزن  $41/4 \pm 1$  گرم و طول  $16/9 \pm 1$  سانتی متر در شوری های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور آکواریوم های ۵۰۰ لیتری شامل گروه شاهد و تیمار شوری ppt4، ppt8 و ppt12 با سه تکرار که با افزودن مقدار مناسب NaCl خالص به آب لوله کشی کلرزدایی شده شهر اهواز انجام گرفت. ماهی ها با رژیم غذایی تجاری بیومار (۴۳ درصد پروتئین، ۱۸ درصد چربی، ۳۰ درصد کربوهیدرات و ۹ درصد فیبر) دو بار در روز با نسبت ۱/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند (۱۰). در طول دوره پارامترهای فیزیکی شیمیایی آب شامل دما، pH، اکسیژن محلول و سختی به وسیله دستگاه ارزیاب آب (Horiba U-10، ژاپن) پایش و آکواریوم ها در دمای  $20 \pm 1$  درجه سانتی گراد تحت دوره نوری طبیعی نگهداری شدند. برای جلوگیری از افزایش آمونیاک و حفظ شوری، روزانه یک سوم آب آکواریوم تخلیه و به همان میزان آب شور آماده شده به هر آکواریوم اضافه می شد (۱۰). نمونه آبشش ۳ ماهی بی هوش شده به وسیله پودر گل میخک نیم گرم بر لیتر با ضخامت نیم سانتی متر در زمان انتقال، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مواجهه جدا و در بافر فرمالین ۱۰ درصد و محلول گلو تار آلدئید (۲/۵ درصد) (Sigma, Germany) قرار گرفتند (۱۱، ۱۲). همچنین روش معمول آماده سازی بافت شامل آب گیری با الکل اتیلیک، شفاف سازی با زایلول و بلوک گیری با پارافین انجام و برش هایی به ضخامت ۴ تا ۶ میکرون با

هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و در نهایت ۵ برش بافتی از هر نمونه و در هر برش حداقل ۶ میدان دید میکروسکوپی به وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت (۱۳).

### میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای آماده سازی نمونه‌ها به روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (Zeiss, Germany) (۳ نمونه پس از تثبیت در گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد با  $\text{pH} = 7/4$  در بافر فسفات ۰/۱ مولار شستشو و سپس در اتانول با درجات صعودی هر کدام از الکل‌های ۹۰ درصد، ۹۵ درصد، ۱۰۰ درصد و استون آب‌گیری شدند. پس از آن توسط نیتروژن مایع منجمد شده و به صورت عمودی بر روی یک سطح غیر رسانا، پوشیده از طلا قرار داده شدند و در نهایت فتومیکروگراف‌های مناسب تهیه شد (۱۴).

### ایمونوهیستوشیمی

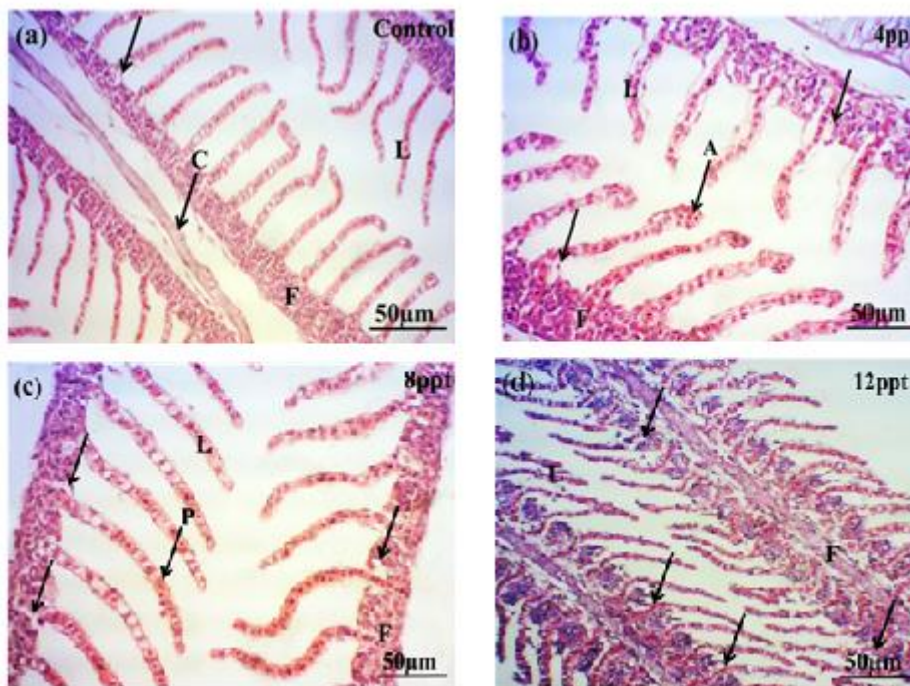
برای تکنیک ایمونوهیستوشیمی مقاطع پارافینی ۴ میکرونی تهیه شده توسط میکروتوم نیمه دیجیتالی تنظیم شده از قبل جهت برش بر روی لام‌های پوشیده شده با Poly L-lysine قرار گرفتند. پس از حذف پارافین توسط زایلول و آب‌گیری در الکل اتانول در محلول PBS شستشو و در محلول A که ترکیبی از PBS، کلرید سدیم و TWEEN خالص قرار داده شد. سپس اسلایدها با محلول B که ترکیبی از PBS و Regiler خالص بوده است آغشته شدند. سپس اسلایدها به مدت ۲ دقیقه در PBS قرار گرفته و در جعبه حاوی هوای مرطوب قرار داده شدند. برای هر لام، ۱۰۰ میکروگرم آنتی ژن IgG $\alpha$ 5 رقیق به PBS اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنتی ژن FITC با غلظت ۱۰۰ درصد به هر لام اضافه و در محیط کاملاً تاریک به مدت یک ساعت انکوبه سپس لام‌ها در PBS شستشو و پس از قرار دادن لام روی آن‌ها برای حفظ خواص فلورسین ژ در یک مکان تاریک قرار داده شدند. در نهایت توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس در فیلترهای ۴۵۰ تا ۴۹۰ نانومتر مشاهده و فتومیکروگراف‌های مربوطه تهیه شد (۱۵). تمامی مواد شیمیایی استفاده شده در این بخش توسط شرکت Merck آلمان تهیه شده بود.

### ۳- آنالیزهای آماری

میانگین  $\pm$  انحراف معیار شامل تعداد، اندازه، تراکم و مساحت دهانه راسی سلول‌های کلراید نمونه‌های شاهد و شوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. اختلاف پارامترها در سطح معنی داری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از SPSS 18 و نسخه ۱۳.۰ در سطح  $p < 0/05$  مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۰).

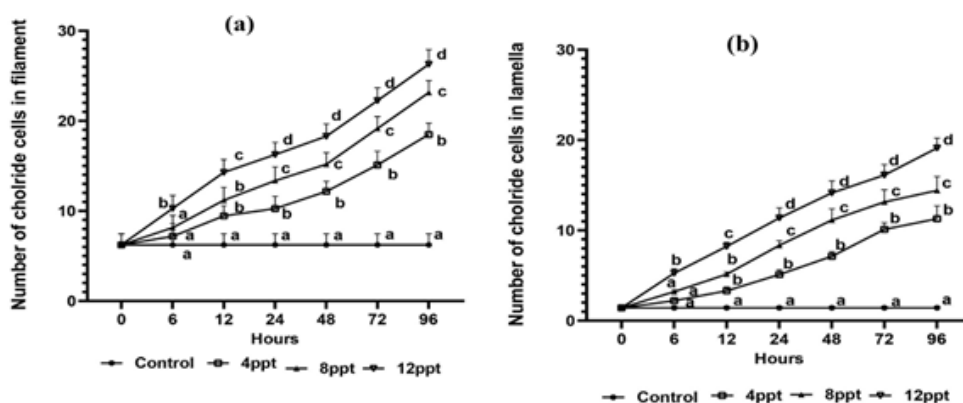
### ۴- نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در طول سازگاری در تیمارهای مختلف مرگ و میری مشاهده نشد. ساختار میکروسکوپی آبشش توسط ساختار غضروفی در قسمت مرکزی، رگ‌های خونی و تیغه‌هایی که توسط انواع سلول‌های کلراید پشتیبانی می‌شدند و سلول‌های نگه‌دارنده بر روی رشته‌ها در نواحی بالا و پایین قرار داشتند مشاهده شد. سلول‌های کلراید در زمان‌های مختلف تحت تاثیر شوری قرار گرفته و به رنگ اسیدوفیلی در لام‌ها ی میکروسکوپی شناسایی شدند. در مطالعه حاضر، دو نوع عمده سلول کلراید در نواحی فیلامنتی و قاعده‌ای - جانبی لاملاها شناسایی شدند (شکل ۱).



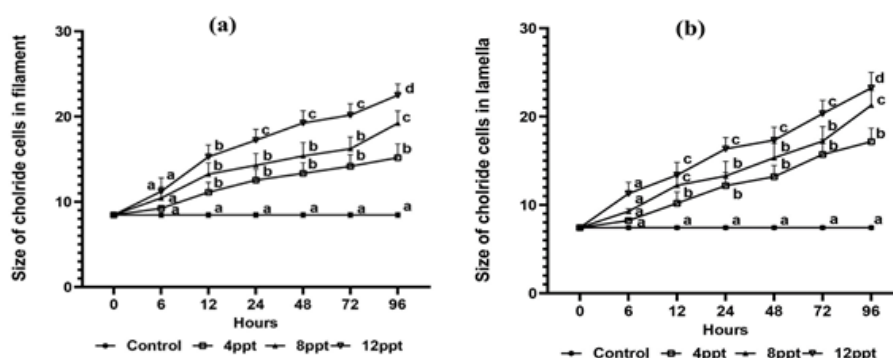
شکل ۱: ساختار میکروسکوپ نوری بافت آبشش در گروه های کنترل (a) و شوری های ۴ ppt (b)، ۸ ppt (c) و ۱۲ ppt (d). F (فیلامنت)؛ L (لاملا)؛ C (غضروف)؛ A (رگ خونی)؛ P (سلول پوشش)؛ سلول های کلراید (فلش مورب). (H & E).

بیشترین تعداد سلول های کلراید فیلامنتی ( $26/1 \pm 28/33$ ) در شوری ۱۲ ppt و کمترین آن ( $24/1 \pm 6/22$ ) مربوط به گروه کنترل بود. به طور کلی، تعداد سلول های کلراید فیلامنتی در سطح میدان دید میکروسکوپی معین در شوری بالا به مقدار زیادی افزایش یافته بود. بیشترین تعداد سلول های کلراید در لاملاهای مورد مطالعه ( $19/1 \pm 11/27$ ) مربوط به شوری ۱۲ ppt و کمترین تعداد مربوط به گروه شاهد ( $1/0 \pm 42/18$ ) بود. بر تعداد سلول های کلراید با افزایش شوری افزوده شده بود (شکل ۲)



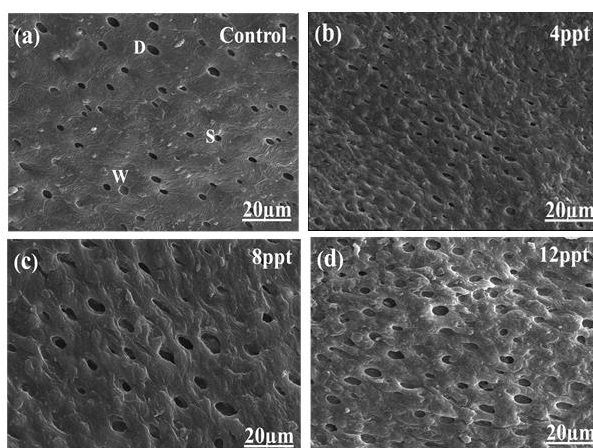
شکل ۲: تعداد سلول های کلراید ( $\mu\text{m}^2$ ) در موقعیت های فیلامنتی (a) و لاملایی (b) در طول دوره سازگاری در زمان و شوری مختلف (حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی داری در سطح  $p < 0/05$ ) است.

بیشترین اندازه سلول‌های کلراید فیلامنتی مربوط به شوری ۱۲ ppt ( $22/51 \pm 1/46$ ) و کمترین آن مربوط به گروه شاهد ( $8/45 \pm 0/28$ ) بود. به‌طور کلی، بر اساس نتایج این مطالعه در شوری و زمان‌های مختلف اندازه سلول‌های کلراید رشته‌ای با افزایش شوری افزایش یافت. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که در برخی از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری در اندازه سلول‌های کلراید رشته‌ای وجود داشت ( $p < 0/05$ ). بیشترین اندازه سلول‌های کلراید لاملایی مربوط به شوری ۱۲ ppt ( $12/72 \pm 1/23$ ) و کمترین آن مربوط به گروه شاهد ( $7/43 \pm 0/22$ ) بود. به‌طور کلی، با افزایش شوری و زمان اندازه سلول‌های کلراید تیغه‌ای افزایش یافت. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه تفاوت معنی‌داری را در اندازه سلول‌های کلراید تیغه‌ای نشان داد. همچنین تفاوت معنی‌داری در اندازه این سلول‌ها در برخی تیمارهای مختلف شوری مشاهده شد ( $p < 0/05$ ) (شکل ۳)

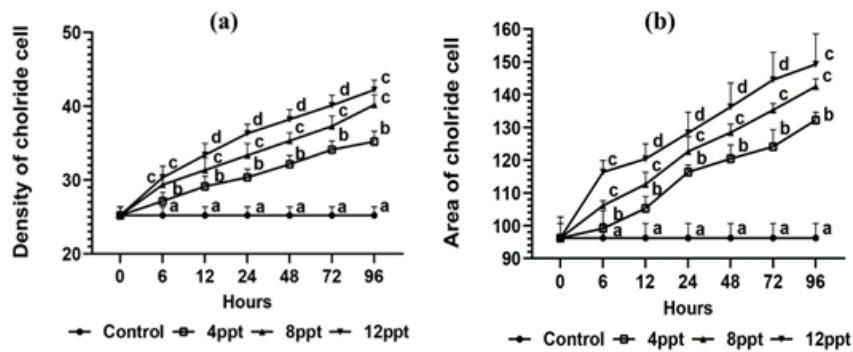


شکل ۳: اندازه سلول‌های کلراید ( $\mu m^2$ ) در موقعیت‌های رشته‌ای (a) و تیغه‌ای (b) در طول دوره سازگاری در زمان و شوری مختلف (حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $p < 0/05$  است).

سه شکل از سلول‌های کلراید در فتومیکروگراف‌های تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی شناسایی شدند. در مقایسه با گروه شاهد تعداد سلول‌های کلراید با حفره عمیق به‌ویژه در شوری ۱۲ ppt افزایش یافت. اما در ساعات اولیه و تمام شوری اکثر سلول‌های کلراید ساختار Shallow basin داشتند. به‌طور کلی، با گذشت زمان، تراکم دهانه سلول‌های کلراید با افزایش شوری افزایش یافت. کم‌ترین تراکم و سطح باز شدن سلول‌های کلراید در گروه کنترل و بیشترین در شوری ۱۲ ppt مشاهده شد (شکل‌های ۴ و ۵).

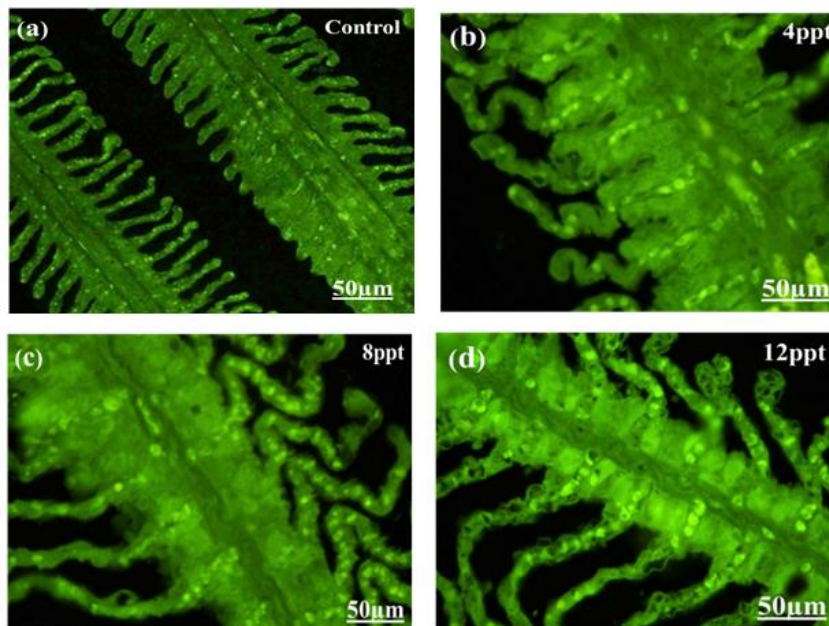


شکل ۴: ساختار میکروگراف الکترونی سلول‌های کلراید در گروه‌های کنترل (a) و شوری‌های ۴ ppt (b)، ۸ ppt (c) و ۱۲ ppt (d) پس از ۹۶ ساعت. Shallow basin (S); Deep hole (D); Wavy convex (W).



شکل ۵: تراکم (a) و مساحت (b) دهانه راسی سلول های کلراید در طول سازگاری با شوری های مختلف (حروف مختلف در هر ستون تفاوت معنی داری را در  $p < 0.05$ ) نشان می دهد.

در مطالعات ایمونوهیستوشیمی سلول های کلراید با چگالی بالا و واکنش های مثبت آنزیم  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$  شناسایی شدند. رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس، روشی برای تشخیص سلول های کلراید، آنها را در نواحی قاعده ای جانبی و فیلامنت آبشش مشخص کرد. بیشترین واکنش  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$  در شوری ۱۲ ppt و در پایان دوره مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۶: ایمونوفلورسانس آنزیم  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$  در گروه های کنترل (a) و شوری های ۴ ppt (b)، ۸ ppt (c) و ۱۲ ppt (d) پس از ۹۶ ساعت.

## ۵- بحث

استفاده از آنتی بادی‌های IgGα5 برای مکان‌یابی آنزیم  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  و در واقع سلول‌های کلراید در حشرات آبی، سخت پوستان و ماهی‌ها به‌عنوان یکی از موفق‌ترین روش‌ها ذکر شده است (۱۶، ۱۷). تنظیم اسمزی در واقع باعث کنترل غلظت الکترولیت‌ها، مواد آلی محلول در مایعات بدن، حفظ تعادل آب و نمک در آبزیان می‌شود. در یک تحقیق گزارش شده است که در آبشش *Sparidentex hasta* سلول‌های کلراید واکنش سریعی به تغییرات ناگهانی شوری داشته بنابراین پس از ۲۴ ساعت، تغییرات قابل توجهی در فراساختار ناحیه دهانه راسی سلول‌های کلراید و تراکم ایجاد شده است (۱۸). همچنین نتایج مشابهی در *Acanthopagrus latus* و *Sparus sarba* گزارش شده است به‌طوری‌که یک روز پس از قرار گرفتن در معرض شوری ppt۶۰ تعداد دهانه‌های راسی سلول‌های کلراید نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد و مساحت این دهانه‌ها در این تیمار افزایش معنی‌داری را نشان داد. این افزایش در تراکم و مساحت در پایان دوره کاهش یافت. همچنین در گونه‌های دریایی مانند *Liza aurata*، اکثر ماهی‌ها به فعالیت  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  واکنش‌های متفاوتی نشان دادند به‌طوری‌که در شوری ppt۲۰ واکنش‌پذیری سلول‌های کلراید کمتر از سایر شوری‌ها بود. این کاهش در واکنش‌پذیری در این شوری تنها در اپی‌تلیوم فیلامنتی گزارش شده بود (۱۹ و ۲۰). سایر محققین در مطالعه بر روی این سلول‌ها در قسمت فیلامنتی *Pagrus auratus* نشان دادند که واکنش‌پذیری سلول‌های کلراید در معرض شوری ppt۲۰ کاهش می‌یابد. محققان معتقدند به‌دلیل کاهش اختلاف غلظت یون‌ها در محیط خارجی و داخلی بدن ماهی نیاز به دفع فعال یون‌های اضافی در محیط مذکور کاهش می‌یابد. بنابراین در یک پاسخ تطبیقی با کاهش تعداد و اندازه سلول‌های کلراید تعداد آنزیم‌ها و ناقل‌های یونی که در غشای سلولی وجود دارند و در نتیجه فعالیت این سلول‌ها کاهش می‌یابد. محققان خاطرنشان کردند که تغییر در تعداد و مساحت سلول‌های کلراید به‌دلیل قرار گرفتن در محیط با شوری بالا و افزایش فعالیت آن‌ها برای دفع یون‌های اضافی Na و Cl می‌باشد (۲۱). پاپی و همکاران (۲۲) نتایج مشابهی را با تحقیق روی سلول‌های کلراید فیلامنتی *A. latus* گونه آب شور بر خلاف گونه آب شیرین مورد مطالعه گزارش کردند. همچنین در این گونه عدم وجود حفره‌های عمیق سلول‌های کلراید پس از سازگاری با شوری ppt۶۰ گزارش شده است. در تحقیق حاضر بر روی آبشش ماهی کپور معمولی که در معرض شوری‌های مختلف و در مدت کوتاه قرار گرفته بود در پایان سازگاری با شوری ppt۱۲ حفره‌های عمیق سلول‌های کلرایدی بیشتر نمایان شدند. در این مطالعه، در شوری ppt۸ و ppt۱۲ تراکم دهانه آپیکال سلول‌های کلراید کمتر از شاهد بود. همچنین شوری در ppt۴ تعداد سلول‌های کلراید با سطح باز بیشتر از سایر تیمارها گزارش شد در حالی که سطح دهانه سلول‌های کلرایدی در ppt۱۲ در روزهای اول کمتر از سایر تیمارها بود که با گزارش سایر محققین بر روی گونه‌های مشابه مطابقت داشت (۲۳). همچنین در مطالعه‌ای بر روی *Mylio macrocephalus* گزارش شد که سطح راسی سلول‌های کلراید در شوری تا ppt۵۰ بیشتر از نوع عمیق بوده است (۲۴). از سوی دیگر در مطالعه‌ای بر روی *Oreochromis mossambicus* تطابق داده شده با در شوری ppt۴۰ گزارش شد که سطح راسی سلول‌های کلرایدی با یک افزایش در تعداد این نوع از سلول‌ها همراه بوده است (۲۵) محققان اخیر گزارش داده‌اند که در روزهای اولیه به‌ویژه در شوری کم نیاز به مواد معدنی برای تنظیم اسمز ضروری است. در مطالعه‌ای بر روی *O. mossambicus* در معرض انواع شوک‌های هیپراسموتیک، از جمله آب شور، چگالی دهانه راسی سلول‌های کلراید ۳ ساعت پس از انتقال به‌طور قابل توجهی کاهش یافت که دلیل این امر کاهش تراکم این سلول‌ها در آبشش ماهی در معرض شوری بوده است (۲۶). همان‌طور که در یک مطالعه اخیر مشاهده شد تغییرات در تعداد و ناحیه دهانه سلول‌های کلراید اغلب می‌تواند با تغییرات در میزان یون‌های Na و Cl مرتبط باشد. تغییرات در دهانه سلول‌های کلراید می‌تواند به‌دلیل افزایش یا تغییر تبادل یونی در محیط‌های هیپراسموتیک و هیپواسموتیک باشد (۲۷). زیرا بر اساس مطالعات متعدد مشخص شد که دهانه‌های راسی سلول‌های کلراید پتانسیل بالایی برای عبور یون‌ها دارند و چنین تغییراتی بیشتر در قسمت‌های راسی این سلول‌ها رخ می‌دهد. این عامل همچنین ممکن است به‌دلیل تغییر در سرعت جذب یا دفع یون بسته به شرایط محیطی ماهی باشد (۲۸). در تحقیق بر روی *Dicentrachus labrax* دریافتند که تعداد

سلول های کلراید در آب دریا در مقایسه با آب شیرین افزایش قابل توجهی را نشان می دهد. از سوی دیگر، مساحت سلول های کلراید در آب دریا نسبت به آب شیرین افزایش معنی داری نشان داد. محققان بر این باورند که در بیشتر گونه های یوری هالین تعداد سلول های کلراید در انتقال از آب شیرین به آب دریا افزایش یافته است، در حالی که برعکس آن کمتر دیده می شود. این جانوران آبی می توانند با طیف وسیعی از شوری ها سازگار شوند. افزایش تعداد سلول های کلراید به دنبال انتقال به شوری های بالاتر ممکن است با افزایش نیاز به ظرفیت انتقال یون در آب دریا یا شوری های بالاتر همراه باشد. این نتیجه با مطالعه یون های مختلف درگیر در تنظیم اسمزی در آبشش ماهی نشان داده شده است (۲۹). مطالعه اخیر نشان داد که سازگاری این گونه با تغییرات شوری محیط به دلیل تغییرات سریع سلول های کلراید برای تنظیم ورود و خروج آب و الکترولیت ها است. به طوری که در شرایط جدید برای سازگاری سلولی، تغییراتی در دهانه های راس ایجاد می شود که میزان آنزیم های حامل الکترولیت را تنظیم می کند.

#### ۶- نتیجه گیری

یافته های پژوهش حاضر نشان داد که کپور معمولی می تواند با شوری های مختلف سازگار شود. تغییرات در ساختار و چگالی روزنه های سلول های کلراید را می توان در لحظات اولیه پس از انتقال تشخیص داد. واکنش پذیری ایمنیایی آنزیم  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  در شوری های بالاتر افزایش می یابد و محلی سازی این آنزیم نشان داد که سلول های غنی از میتوکندری آبشش های کپور در فیلامنت و به ندرت در اپی تلیوم لایه ای وجود دارند. همچنین در زیر میکروسکوپ الکترونی روبشی برای تشخیص تغییرات سریع در تعداد و مساحت راسی سلول های کلراید برای ارزیابی تحمل به شوری در این ماهی می توان تاکید کرد.

#### ۷- تشکر و قدردانی

از زحمات و حمایت همه جانبه معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به ویژه در تقبل هزینه صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

#### ۸- منابع

1. Abdi R, Pourkhadje MR, Zolgharnein H, Hoseinzade Sahafi H, et al. Effect of salinity on mitochondria of chloride cells in gill of juvenile's grouper (*Epinephelus coioides*). Journal of Animal Environment. 2011; 2 (48): 37-42.
2. Chang IC, Lee TH, Yang CH, Wei YY, et al. Morphology and Function of Gill Mitochondria-Rich Cells in Fish Acclimated to Different Environments. Physiology Biochemistry Zoology. 2001; 74(1): 111-119.
3. Varsamos S, Diaz JP, Charmantier G, Blasco C, et al. Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentraachus labrax*) adapted to fresh water, seawater, and doubly concentrated seawater. Journal of Experimental Zool. 2002; 293: 12- 26.
4. Dastan V, Abdi R, Movahedinia AA, Salari-Aliabadi MA. Study of gill and kidney tissue changes in *Tenualosa ilisha* during migration from sea to the Karun and Bahmanshir rivers. Iranian Fisheries Science Journal. 2017; 25(4): 53-62.
5. Morovvati H, Abdi R, Shamsi MM. Effect of different salinity concentration on gill of benni *Barbus sharpeyi*. Journal of Veterinary Reserch. 2017; 72(2): 243-24.

6. Carmona R, Garcia-Gallego M, Sanz A, Domezain A, et al. Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. *Journal of Fish Biology*. 2014; 64: 553-566.
7. Rumiani E, Abdi R, Zolgharnein H, Morovati H, et al. Histology of kidney tubules and Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> Atpase immunolocalization of ionocyte cells in the tubules of grouper juveniles (*Epinephelus coioides*). *Journal of Marine Science Technology*. 2010; 9(1): 4 - 12.
8. Sabery M, Abdi R, Morovvati H, Ronagh M, et al. Study of histopathology in gill of *Liza klunzingeri* Caused by industrial and municipal wastewater pollution. *Journal of Animal Environment*. 2014; 6(3): 225-231.
9. Blank T, Burggren W. Hypoxia-induced developmental plasticity of the gills and air-breathing organ of *Trichopodus trichopterus*. *Journal of Fish Biology*. 2014; 291: 808-826.
10. Salati AP, Baghbanzadeh A, Soltani M, Peyghan R, Riazi G. Effect of different levels of salinity on gill and kidney function in common carp *Cyprinus carpio* (Pisces: Cyprinidae). *Italian Journal of Zoology*. 2011; 78(3): 298-303.
11. Basir Z, Peyghan R. The process of kidney gradual changes in, *Tenuulosa ilisha* during migration from sea to the river. *Journal of Persian Gulf*. 2016; 7(26): 47-56.
12. Lin C, Huang C, Yang C, Lee T, et al. Time-Course Changes in the Expression of Na, K-ATPase and the Morphometry of Mitochondrion-Rich Cells in Gills of Euryhaline Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) During Freshwater Acclimation. *Journal of Experimental Zoology*. 2004; 301:85-96.
13. Moradkhani A, Abdi R, Salari Ali-Abadi MA, Nabavi S, et al. Quantification and description of gut-associated lymphoid tissue in, shabbout, *Arabibarbus grypus* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae), in warm and cold season. *Acta Ichthyologica et Piscataria*. 2020; 50(4): 423-432.
14. Platell ME, Ang HP, Hesp SA, Potter IC. Comparisons between the influences of habitat, body size and season on the dietary composition of the sparid *Acanthopagrus latus* in a large marine embayment. *Estuar Coastal Shelf Science*. 2007; 72: 626-634.
15. Al-Balawi HF, Al-Akel A, Al-Misned AS, Suliman F, et al. Effects of sub-lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills, liver, kidney and muscle and its accumulation in these organs of *Clarias gariepinus*. *Brazilian Archive of Biology Technology*. 2013; 56: 293-302.
16. Basir Z, Peyghan R. Immunohistochemical and ultrastructural study of the effect of different salinities on gill chloride cells of *Cyprinus Carpio*. *Iranian Fisheries Science Journal*. 2016; 28(5): 131-141.
17. Camps L, Serret J, Ramos-López D, Gonzalez-Linares J, et al. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants, a field study in the Bizerte Lagoon. *Tunisia Chemospher*. 2015; 135: 67-74.
18. Evans DH, Piermarini PM, Cho KP. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Journal of Experimental Biology*. 2005; 85: 97-177.

19. Manoharan S, Mathan R, Rakpong P, Rama Krishnan P. Influence of environmental salinity and cortisol pretreatment on gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase activity and survival and growth rates in *Cyprinus carpio*. Aquaculture Report. 2018; 11: 1-7.
20. Pisam M, Boeuf G, Prunet P, Rambourg A. Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. Journal of Experimental Biology. 1998; 187: 21-31.
21. Pereira S, Pinto AL, Cortes R, Fontainhas-Fernandes A, et al. Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. Ecotoxicology Environmental Safety. 2013; 90: 157-166.
22. Papi H, Abdi R, Movahedinia AA. Morphological changes of mitochondria-rich cells in gill of *Sparidentex hasta* during adaptation to different environmental salinities by scanning electron microscopy. Journal of Marine Science Technology. 2016; 15(1): 121-131.
23. Pourkhadje MR, Abdi R, Zolgharnein H, Hoseinzade Sahafi H, et al. Histology and immunolocalization of ionocyte cells in gill of juvenile's Grouper (*Epinephelus coioides*). Journal Oceanography. 2011; 2(6): 1-6.
24. Khodabandeh S, Shahriarimoghaddam M, Abtahi B. Changes in Chloride Cell Abundance, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Immunolocalization and Activity in the Gills of Golden Grey Mullet, *Liza aurata*, Fry During Adaptation to Different Salinities. Yakhteh Medical Journal. (2009a); 11(1): 49 -54.
25. Papi H, Movahedinia A, Abdi R. Immunohistochemical study on gill chloride cells in Sobaity, *Sparidentex hasta* under different environmental salinities. Journal of Veterinary Reserch. 2016; 71(2): 127-133.
26. Fonseca AR, Sanches Fernandes LF, Fontainhas-Fernandes A, Monteiro SM, et al. From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. Science Total Environment. 2016; 550 (3): 972-986.
27. Fridman S. Ontogeny of the osmoregulatory capacity of teleosts and the role of ionocytes. Fronter Marine Science. 2020; 7: 709-716.
28. Moron S, Oba E, Andrade C, Fernandes M. Chloride Cell Responses to Ion Challenge in Two Tropical Freshwater Fish, the Erythrinids *Hoplais malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. Journal of Experimental Zoology. 2003; 298: 93-104.
29. Wang PJ, Lin CH, Hwang LY, Huang CL, et al. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology. 2003;152(4): 544-551.