

تأثیر پپتیدهای استخراجی از موکوس شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni*
بر بافت آبشش، اسمولاریته و یون‌های پلاسمای بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان
Oncorhynchus mykiss

راضیه صالح‌پور^۱، صابر خداپنده^{۲*}

تاریخ دریافت: آبان ۹۳

تاریخ پذیرش: بهمن ۹۳

چکیده

در این پژوهش، استخراج پپتیدهای موکوس شقایق دریایی و اثرات آن‌ها بر بافت آبشش بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. بدین منظور نمونه‌برداری از شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* در ناحیه بین جزرومدی سواحل جزیره هرمز انجام گرفت. نمونه‌ها بعد از فریز شدن به آزمایشگاه منتقل شدند. بخش موکوسی نمونه‌ها با استفاده از PBS عصاره‌گیری شد. پپتیدهای پائین‌تر از ۱۰ کیلودالتون به وسیله فیلتر MWCO ۱۰۰۰۰ میلی‌پور جدا و به سیاهرگ دمی بچه‌ماهی‌ها تزریق شد. بعد از بی‌حال شدن ماهی‌ها، با روش‌های بافت‌شناسی کلاسیک و ایمونوهیستوشیمی تغییرات بافتی، میزان حضور آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ ، اسمولاریته و یون‌های پلاسمای در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. انواع آسیب‌های بافتی شامل هیپرتروفی سلول‌های اپیتلیالی، بدشکلی انتهای لاملاها، ادم زیر بافت پوششی، نزدیک شدن لاملاها در ناحیه بین لاملایی و نکروز در بافت آبشش ماهی‌های مورد مطالعه مشاهده شد. تزریق این پپتیدها همچنین باعث کاهش یون‌ها و اسمولاریته پلاسمای خون ماهی شد. نتایج نشان داد که این پپتیدهای استخراجی از موکوس شقایق دریایی می‌توانند باعث تغییرات بافتی آبشش، تغییر در اسمولاریته و یون‌های پلاسمای بچه‌ماهی قزل‌آلای شوند و در نتیجه این تغییرات باعث اختلال در عملکرد تنظیم اسمزی و در نهایت مرگ ماهی می‌شود.

واژگان کلیدی: آبشش، *Stichodactyla haddoni*، *Oncorhynchus mykiss*، IgG 5

۱- کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

* نویسنده مسئول: surp78@gmail.com

مقدمه

تا کنون، بیش از ۵۰ سم بلوکه کننده جایگاه ۳ کانال سدیمی و تقریباً ۱۰ سم بلوکه کننده کانال پتاسیمی K_v1 از گونه‌های مختلف شقایق دریایی جدا شده است (Honma et al., 2008)، که شامل سموم کانال سدیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ ۳-۵ کیلودالتونی (Honma and Shiomi, 2006)، سموم کانال‌های پتاسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ ۳/۵-۶/۵ کیلودالتونی (Yeung et al., 2005) و سموم تشکیل‌دهنده منفذ در غشا سلولی معمولاً ۲۰ کیلودالتونی (Anderluh and Macek, 2002) هستند.

همچنین چهار سم پتیدی شامل SHTX I-III با اثر فلج‌کنندگی خرچنگ و SHTX IV با اثر کشندگی، از شقایق دریایی گونه *Stichodactyla haddoni* جداسازی و گزارش شده است، که SHTX I، SHTX II و SHTX III سم‌های کانال پتاسیمی هستند و SHTX IV از سم‌های جایگاه ۲ کانال سدیمی شقایق دریایی است. علاوه بر این چهار پتید، یک پتید شبه فاکتور رشد اپیدرمال نیز از *S. haddoni* جدا شده است (Honma et

به دلیل حساسیت و پیچیدگی اقیانوس‌ها، جانوران ساکن این محیط، مخصوصاً جانوران ثابت یا کُند حرکت، از ترکیبات و متابولیت‌های متفاوت به عنوان مکانیسم دفاعی استفاده می‌کنند. این ترکیبات معمولاً بسیار سمی بوده و نشانگر محیط شدیداً رقابتی در این جانداران است (Chellaram and Edward, 2009). شقایق‌های دریایی از شاخه مرجانیان، رده آنتوزوا، جانوران کُند حرکتی هستند که پلی‌پتیدها و پروتئین‌هایی با خاصیت سیتولیتیک و سم‌های عصبی دارند. این سموم در پوشش مخاطی سراسر بدن یا در نماتوسیت این جانوران وجود دارند که آن‌ها را از شکارچیان محافظت می‌کنند و در هدف قرار دادن جانوران مختلف از جمله سخت‌پوستان و مهره‌داران موثر هستند (Frazao et al., 2012). سموم شقایق دریایی شامل سموم کانال‌های سدیمی و پتاسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ، سموم کانال‌های یونی حساس به اسید، سیتولیزین‌ها، سمومی با فعالیت مهارکنندگی پروتئاز و سم‌هایی با فعالیت فسفولیپاز A_2 هستند (Frazao et al., 2012).

در یک جزر کامل ۷ نمونه از این گونه شقایق دریایی از مناطق بین جزر و مدی جمع‌آوری و با تانک ازت به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج پروتئین از جانور، موکوس در دمای پائین با کمک قاشقک جدا و در دستگاه فریز درایر خشک شد. برای عصاره‌گیری، ۴ گرم موکوس خشک در ۸۰ میلی‌لیتر PBS (۷ pH) حل و هم‌وزن شد (Khodabandeh and Fouchereau-Peron, 2012). سپس مخلوط به دست آمده سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل، پس از عبور از فیلتر پارچه‌ای با چشمه ۵۰۰ میکرومتری، در فریز درایر خشک شد و جداسازی اجزاء آن بر اساس قطبیت، با استفاده از حلال‌های آن-هگزان، اتیل استات (ترکیبات با قطبیت کم‌تر) و آن-بوتانول و آب مقطر (ترکیبات قطبی‌تر) ادامه پیدا کرد (Riguera, 1997; Ebada et al., 2008). عصاره‌های به‌دست آمده به منظور حلال پراکنی در دستگاه فریز درایر خشک شد (Khosravi et al., 2012).
سنجش پروتئین کل با روش برادفورد صورت گرفت و جذب نمونه‌ها در دستگاه الیز

(al., 2008). به‌طور کلی فقط ماهی‌های همزیست، لایه موکوسی محافظت کننده برای مقابله با سموم شقایق‌های دریایی دارند (Mebs, 2009) اما ماهی‌های دیگر در برابر این سموم آسیب‌پذیر هستند. این سموم می‌توانند باعث اثرات متفاوتی بر روی ماهی‌ها شوند. تا کنون مطالعه‌ای بر روی گونه‌های مختلف شقایق دریایی از جمله *S. haddoni* در خلیج فارس و اثرات آن‌ها صورت نگرفته است، از این رو در مطالعه حاضر از موکوس شقایق دریایی *S. haddoni* خلیج فارس با استفاده از محلول بافر فسفات نمکی (PBS¹) عصاره‌گیری شد و پپتیدهای پائین‌تر از ۱۰ کیلودالتون به وسیله الترافیلتراسیون جداسازی و تاثیر آن‌ها بر روی بافت آبشش، میزان حضور آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ اسمولاریته و یون‌های پلاسما ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج پروتئین

نمونه‌برداری از گونه شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* در آذر ماه سال ۱۳۹۱ از ساحل شرقی جزیره هرمز انجام شد.

1- Phosphate Buffered Saline

ریدر (USA, EpochBiotec) در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

جداسازی پپتیدها با فیلتر میلی پور

۰/۵ گرم پروتئین کل در ۵ میلی لیتر PBS حل شد. سپس این محلول با ورتکس شیک شد. جداسازی پپتیدها برای تزریق به بچه ماهیان قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از فیلتر Amicon® Ultra-15 10K میلی پور از طریق سانتریفیوژ با دور ۱۱۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ دقیقه صورت گرفت و پپتیدهای مورد نظر با تفکیک شدن در بالا و پائین فیلتر جداسازی شدند. در این مرحله نیز سنجش با استفاده از معرف برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر و رسم نمودار استاندارد صورت گرفت. پپتیدهای پائین فیلتر وزن مولکولی پائین تر از ۱۰ کیلودالتون دارند که پپتیدهای موثر بر کانالهای یونی هستند. بعد از جداسازی پپتیدها، آن‌ها را فریز درایر کرده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر PBS اضافه شد. سپس دوباره سنجش انجام گرفت و پپتیدهای باقی مانده تا زمان تزریق در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تهیه ماهی و شرایط نگهداری بچه ماهی

در این مطالعه ۱۰۰ قطعه بچه ماهی قزل آلی رنگین کمان با وزن تقریبی ۱-۲ گرم از استخر پرورش ماهیان سردآبی واقع در شهرستان نور تهیه شد. طی گذراندن یک هفته سازگاری، ماهی‌ها با غذای تجاری تغذیه شدند. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب نیز در طول دوره آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفت. ماهی‌ها در آبی با دمای ۱۹-۱۵ درجه سانتی گراد و pH ۷/۶-۸/۳ قرار داده شدند و طول دوره روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در نظر گرفته شد.

تزریق پپتیدهای پائین تر از ۱۰ کیلو دالتون به بچه ماهی‌ها

۲۰ میکرولیتر از پپتیدهای پائین تر از ۱۰ کیلودالتون با ۳۰ میکرولیتر از PBS حل شد و به مدت ۱۵ دقیقه در معرض اشعه UV قرار گرفت. سپس این دز به درون سیاهرگ ساقه دمی بچه ماهی‌ها (۹ قطعه) تزریق شد. نمونه‌های شاهد (۹ قطعه) با تزریق ۵۰ میکرولیتر محلول PBS (pH ۷)، مورد بررسی قرار گرفتند.

بافت شناسی

جهت مطالعات بافت‌شناسی نمونه‌های ماهی به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن فیکس شدند. پس از آن آبشش از ماهی جدا شده، توسط اتانول ۷۰ درصد تا خارج شدن کامل فیکساتیو آبکشی شد. بعد از آب‌گیری، قالب‌گیری با پارافین مرک صورت گرفت. قالب‌ها بعد از خشک شدن در یخچال قرار داده شدند. با استفاده از میکروتوم (مدل Microds 4055، شرکت دید سبز) برش‌های ۵ میکرومتری از بلوک‌ها تهیه شد. برش‌ها پس از قرارگیری روی لام به روش هماتوکسیلین-اوتوزین رنگ‌آمیزی شدند. سپس، لام‌ها با چسب هیستولوژی مونتاژ شدند و با میکروسکوپ نوری (مدل Nikon 3200) مطالعه و با دوربین (Olympus DP72) عکس‌برداری شدند (Martoja and Martoja-Pierson, 1967;) (Khodabandeh et al., 2005;) (Khodabandeh et al., 2009).

بررسی ایمونوهیستوشیمی

تعیین مکان حضور آنزیم Na^+/K^+ -ATPase با استفاده از آنتی‌بادی IgG 5 (آنتی‌بادی مونوکلنال به دست آمده از موش علیه زیرواحد آلفا آنزیم Na^+/K^+ -ATPase

جوجه) و آنتی‌بادی FITC (Fluorescein Isothiocyanate Conjugate) و میکروسکوپ فلئوئورسانس انجام گرفت (Khodabandeh et al., 2005;) (Khodabandeh et al., 2009).

برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، لام‌ها بعد از پارافین‌زدایی در گزین و آب‌دهی در سری کاهش الکل اتانول، به ترتیب ۲ دقیقه در محلول PBS_1 (۳ قرص بزرگ PBS در ۱۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۱۰ دقیقه در محلول PBS_2 (۲۵۰ میلی‌لیتر PBS_1 + ۲/۱۸ گرم کلرید سدیم + ۴۰ میکرولیتر Tween) و ۲۰ دقیقه در محلول PBS_3 (۲۰۰ میلی‌لیتر PBS_2 + ۱۰ گرم شیر خشک Regiler) قرار داده شدند. سپس لام‌ها به مدت ۲ دقیقه در محلول PBS شستشو داده شد و داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب چیده شد. بر روی هر لام آنتی‌بادی IgG 5 رقیق شده در محلول PBS_4 (۲ میلی‌لیتر PBS_3 + ۸ میلی‌لیتر آب مقطر) به نسبت ۵۰٪ آنتی‌بادی و ۵۰٪ PBS_4 اضافه شد و به مدت ۲/۵ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از شستشوی آنتی‌بادی اضافی با PBS، آنتی‌بادی FITC (۱۵ میکرولیتر آنتی‌بادی + ۹۸۵ میکرولیتر PBS_4) روی هر لام اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت در

اندازه‌گیری یون‌های پلاسما

اندازه‌گیری یون‌ها، با استفاده از دستگاه HPLC، صورت گرفت. برای رسم منحنی کالیبراسیون به منظور به دست آوردن غلظت نمونه‌ها، از محلول‌های استاندارد استفاده شد. برای یون سدیم از تیترازول استاندارد سدیم ۲۲۹۰ میلی‌گرم بر لیتر، برای یون پتاسیم از محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ساخته شده از کلرید پتاسیم در آب و برای یون کلر از محلول استاندارد کلر ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ساخته شده از کلرید سدیم در آب استفاده شد. برای اندازه‌گیری آنیون‌ها و کاتیون‌ها از دستگاه HPLC (Shimadzu: CTO-10AC, Column Oven, LC-10AD, Pump: LC-10AD, آشکارساز: CDD-6A) استفاده شد. برای اندازه‌گیری آنیون کلر از ستون Shim-Pack IC-A1 و فاز متحرک ۲/۵ میلی‌مولار فتالیک اسید و ۲/۴ میلی‌مولار تریس هیدروکسیل‌متیل‌آمینومتان، برای اندازه‌گیری کاتیون‌های یک ظرفیتی سدیم و پتاسیم از ستون Shim-pack IC-C1 و فاز متحرک ۵ میلی‌مولار اسید نیتریک استفاده شد (Chang and Fang, 2007).

محیط کاملاً تاریک نگه داشته شد. سپس لام‌ها با محلول PBS شستشو و پس از لامل‌گذاری با چسب مخصوص هیستولوژی مونتاژ شدند. لام‌ها توسط میکروسکوپ فلوئورسانس با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر مشاهده و با دوربین (Olympus DP72) عکس‌برداری شدند (, Khodabandeh et al., 2009; Khodabandeh et al., 2005).

آنالیز پلاسما

برای اندازه‌گیری اسمولاریته و سنجش یون‌ها، خون‌گیری با قطع ساقه دم و به وسیله سمپلر ۱۰ میکرونی صورت گرفت و خون در میکروتیوبی که بر روی یخ قرار داشت (جهت جلوگیری از منعقد شدن خون)، ریخته شد. سپس میکروتیوب‌های حاوی خون در سانتیفریوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از آن پلاسما به وسیله سمپلر جدا شده، اسمولاریته آن با اسمومتر (-Gonotec-030 m) اندازه‌گیری شد. سپس مقداری از پلاسما برای سنجش یون‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (et al., 2004). (Lin

اندازه‌گیری مساحت فیلامنت‌ها و شمارش یونوسیت‌ها

شمارش یونوسیت‌ها با استفاده از تصاویر تهیه شده از مطالعات ایمونوهیستوشیمی صورت گرفت. از ۹ لام ایمونو شده از هر تیمار با میکروسکوپ فلئورسانس عکس گرفته شد و با استفاده از نرم‌افزار Image J در محیط ویندوز ۷، تعداد یونوسیت‌ها و مساحت فیلامنت‌ها محاسبه شد، بدین صورت که از هر لام بر روی برش طولی یا عرضی فیلامنت ترانسکت‌های تصادفی انتخاب و تعداد سلول‌ها و مساحت فیلامنت‌ها اندازه گرفته شد. میانگین تعداد و مساحت فیلامنت‌ها در هر تیمار (به عنوان گروه) محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت (Varsamos, 2002).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از شمارش تعداد یونوسیت‌ها و اندازه‌گیری مساحت فیلامنت‌ها، تغییرات یون‌های پلاسما و اسمولاریته با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. برای تعیین اختلاف بین گروه‌ها از آزمون t مستقل و برای رسم نمودارها از Microsoft Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

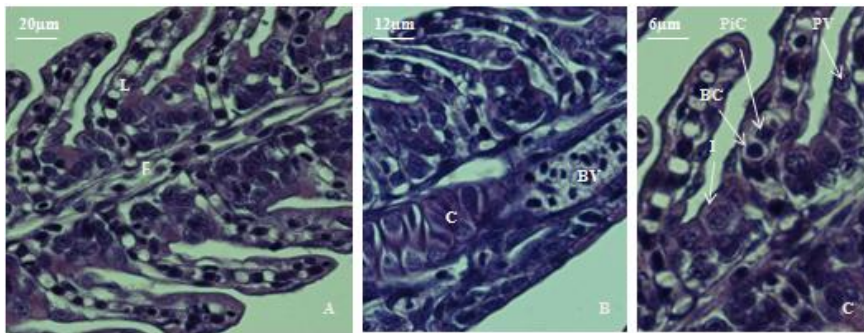
نتایج حاصل از بررسی محتوای پروتئینی برای عصاره PBS، ۳۵/۱۹ میلی‌گرم در یک گرم بافت خشک به دست آمد، که مقدار آن در مسیر جداسازی با حلال‌های آلی ان-هگزان، اتیل استات و ان-بوتانول به ترتیب به ۳۴/۱۱، ۲۳/۶۶ و ۱۹/۱۲ میلی‌گرم در گرم بافت خشک کاهش یافت. میزان پپتیدهای پائین‌تر از ۱۰ کیلودالتون از پروتئین کل عصاره آبی بافر فسفات نمکی ۸۶/۵۹ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

بعد از ۱۲ ساعت تزریق پپتیدهای استخراج شده از مخاط، ۷۵ درصد بچه‌ماهی‌ها تلف شدند و بقیه آن‌ها زنده ماندند.

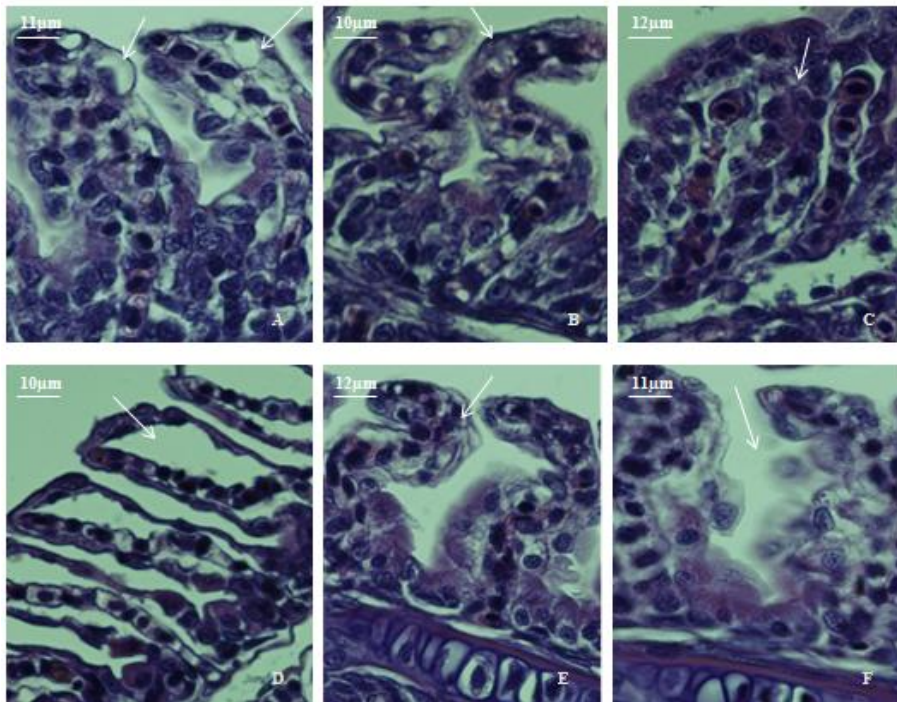
مشاهدات بافت‌شناسی نمونه آبشش بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شاهد نشان داد که کمان آبششی به وسیله فیلامنت‌ها پوشیده شده بود و در دو طرف فیلامنت‌ها، لاملاها به صورت منظم قرار داشتند (شکل ۱A). بر روی فیلامنت‌ها، برش رگ‌های خونی و گاهی سلول‌های خونی و بافت غضروفی نیز دیده شد (شکل ۱B). همچنین سلول‌های خونی، پیلار و سنگفرشی بر روی لاملا و یونوسیت‌ها با اندازه درشت و شکل کروی در ناحیه بین لاملایی وجود داشت (شکل ۱C). در نتیجه تزریق

همانند نمونه شاهد، نشان داد که یونوسیت‌ها روی فیلامنت (شکل‌های ۳A، ۳B و ۳F)، در پایه و بین لاملاها (شکل‌های ۳A، ۳C و ۳G) و به مقدار زیاد بر روی لاملاها قرار داشتند (شکل‌های ۳A، ۳D و ۳H). یونوسیت‌ها تقریباً به صورت مجتمع دیده می‌شوند که نسبت به سلول‌های خونی رنگ‌پذیری متفاوتی را نشان می‌دهند (شکل ۳A). یونوسیت‌ها به صورت کروی تا تخم‌مرغی شکل بودند و هسته آن‌ها هیچ گونه ایمونوفلوئورسانتی را از خود نشان نداد (شکل ۳E).

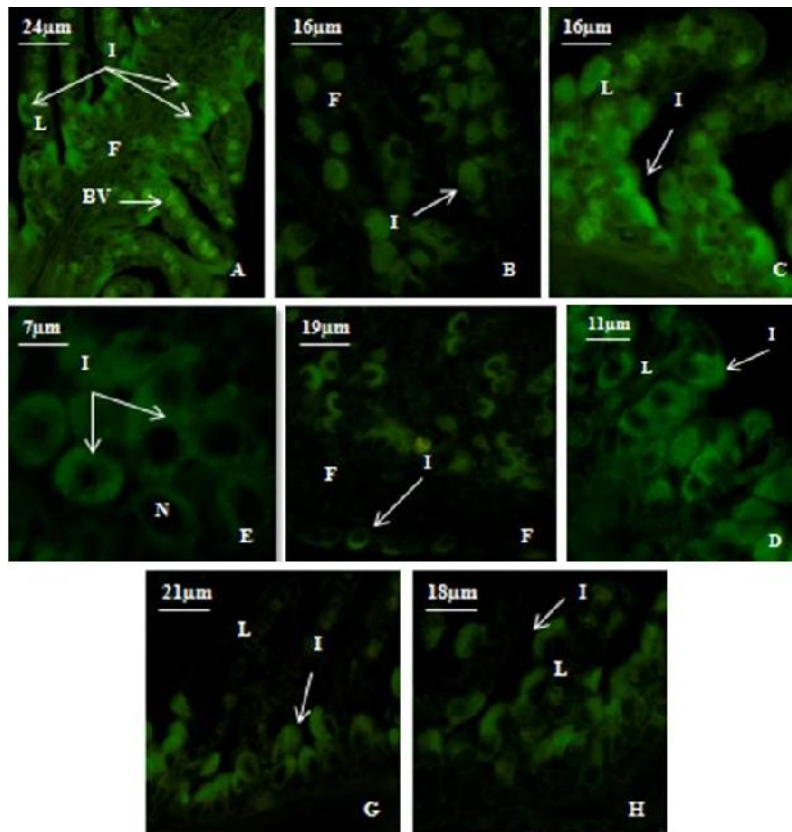
پپتیدهای مخاطی به بچه‌ماهی قزل‌آلا، آسیب‌های بافتی متنوعی مشاهده شد. از جمله این ناهنجاری‌ها می‌توان به هایپرتروفی (شکل ۲A)، S شدن لاملاها (شکل ۲B)، جمع شدن لاملاها در بخش‌های مختلف بافت پوششی به ویژه در پایه و بین لاملاها (شکل ۲C)، ادم زیر بافت پوششی (شکل ۲D)، بدشکلی انتهای لاملاها (شکل ۲E)، نکروز اپیتلیالی (شکل ۲F)، اشاره کرد. مکان‌یابی یونوسیت در آبشش بچه‌ماهیانی که به آن‌ها پپتیدهای استخراجی از مخاط شقایق دریایی تزریق شد (شکل‌های ۳A-H)،



شکل ۱: ساختار بافت آبشش در نمونه شاهد. A: برش طولی فیلامنت آبششی در نمونه شاهد. لاملاها به صورت منظم در دو طرف فیلامنت به خوبی قابل رویت است. B: در محور میانی فیلامنت بخشی از رگ خونی محتوی سلول‌های خونی و همچنین بافت غضروفی مشاهده می‌شود. C: برش طولی لاملا؛ سلول‌های خونی، پیلار و سنگفرشی بر روی لاملا و یونوسیت‌ها با اندازه درشت و شکل کروی در ناحیه بین لاملایی دیده می‌شود. L: لاملا؛ F: فیلامنت؛ BV: رگ خونی؛ BC: سلول خونی؛ C: بافت غضروفی؛ I: یونوسیت؛ PiC: سلول پیلار؛ PC: سلول سنگفرشی (H&E).

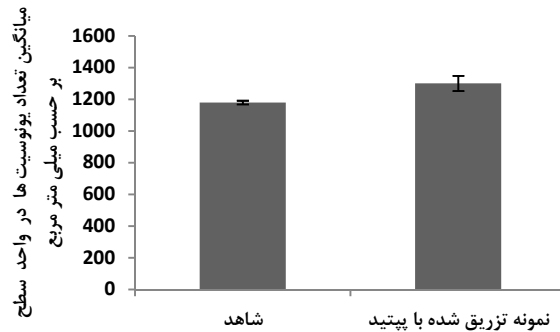


شکل ۲: انواع تغییرات بافتی مشاهده شده در آبشش بچه ماهی قزل‌آلا بعد از مواجهه با پیتیدهای پائین تر از ۱۰ کیلو دالتون. A: هایپرتوفی سلول‌های اپیتلیالی. B: S شکل شدن لاملا. C: جمع شدن لاملاها در ناحیه بین لاملایی. D: ادم زیر بافت پوششی. E: بدشکلی انتهای لاملاها. F: نکروز سلول‌های اپیتلیالی (H&E).



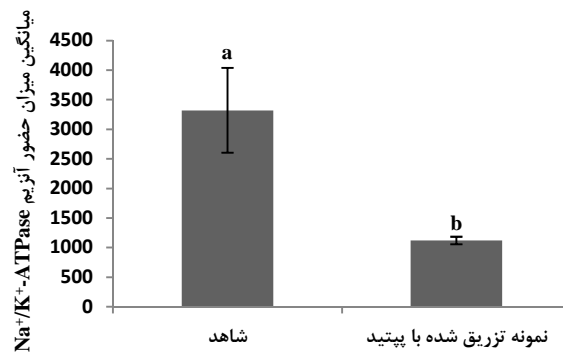
شکل ۳: نمایی از یک فیلامنت و لاملاهای متصل به آن و یونوسیت‌ها روی لاملاها و فیلامنت در بچه‌ماهی قزل‌آلا شاهد و بچه‌ماهی که به آن پپتیدهای پائین‌تر از ۱۰ کیلو دالتون تزریق شده است. اشکال A-D: نمونه شاهد. A: قسمتی از برش طولی فیلامنت و لاملاها؛ یونوسیت‌ها در سه موقعیت دیده می‌شوند: روی لاملاها، ناحیه بین لاملایی و فیلامنت. یونوسیت‌ها به صورت مجتمع در ناحیه بین لاملایی دیده می‌شوند و نسبت به سلول‌های خونی رنگ‌پذیری کاملاً متفاوتی دارند. B: یونوسیت‌ها بر روی فیلامنت قابل رویت هستند. C: حضور یونوسیت‌ها در ناحیه بین لاملایی را نشان می‌دهد. D: یونوسیت‌ها بر روی لاملا دیده می‌شوند. E: یونوسیت‌ها به صورت کروی تا تخم‌مرغی شکل هستند و هسته گرد و بزرگ دارند. هسته‌های آن‌ها هیچ گونه ایمونوفلوئورسانتی را از خود نشان ندادند. اشکال F-H: نمونه‌ای که پپتیدهای پائین‌تر از ۱۰ کیلو دالتون به آن تزریق شده است. F: یونوسیت‌ها بر روی فیلامنت. G: یونوسیت‌ها در ناحیه بین لاملایی. H: یونوسیت‌ها بر روی لاملا. L: لاملا؛ F: فیلامنت؛ I: یونوسیت؛ BC: سلول خونی؛ N: هسته.

مقایسه تعداد یونوسیت‌ها در نمونه شاهد با پپتید، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۴).
تعداد این سلول‌ها در نمونه تزریق شده با



شکل ۴: مقایسه تعداد یونوسیت‌ها در بخش‌های مختلف آبشش نمونه شاهد با نمونه تزریق شده با پپتید.

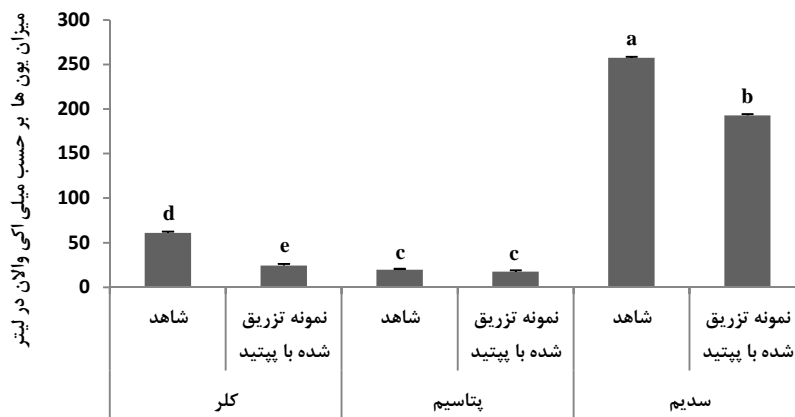
میزان حضور پمپ سدیم-پتاسیم در نمونه تزریق شده با پپتید نسبت به نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد، به طوری که میزان حضور این پمپ در نمونه تزریق شده با پپتید نسبت به نمونه شاهد کم‌تر بود (شکل ۵).



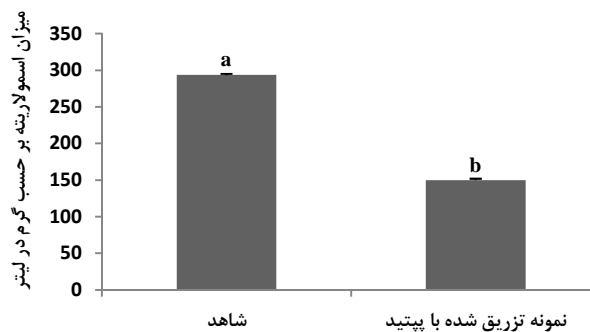
شکل ۵: مقایسه میزان حضور آنزیم Na⁺/K⁺-ATPase در نمونه شاهد با نمونه تزریق شده با پپتید. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است.

میزان یون‌های سدیم و کلر در نمونه تزریق شده با پیتید نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد، در حالی که میزان یون پتاسیم در نمونه تزریق شده با پیتید نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۶).

میزان اسمولاریته پلاسما در نمونه تزریق شده با پیتید نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۷).



شکل ۶: مقایسه میزان یون سدیم، کلر و پتاسیم در نمونه شاهد با نمونه تزریق شده با پیتید. حروف غیریکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۷: مقایسه اسمولاریته در نمونه شاهد با نمونه تزریق شده با پیتید، حروف غیریکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است.

بحث

مطالعات پیشین نشان داد که لایه مخاطی سطح بدن اغلب شقایق‌های دریایی دارای مقادیر قابل توجهی سموم پروتئینی و پپتیدی است که تماس این ترکیبات با جانوران مختلف از جمله ماهی‌ها دارای اثرات زیان‌باری است (Frazao et al., 2012). از جمله سموم پپتیدی شقایق دریایی *S. haddoni* می‌توان به سموم کانال پتاسیمی و سدیمی وابسته به ولتاژ اشاره کرد که دارای وزن مولکولی کم‌تر از ۱۰ کیلودالتون هستند (Yeung et al., 2005; Honma and Shiomi, 2006). به علت اینکه لایه مخاطی سطح بدن اغلب شقایق‌های دریایی حاوی مقادیر قابل توجهی توکسین است، از موکوس به عنوان منبعی برای استخراج پروتئین و پپتید استفاده شد (Primor, 1985). جداسازی اجزا بر اساس پروتوکل Ebada (۲۰۰۸) انجام گرفت که مشاهده شد در مسیر جداسازی میزان پروتئین کاهش یافت.

تزریق وریدی پتیدهایی کم‌تر از ۱۰ کیلودالتون (سموم عصبی)، باعث افزایش مدت زمان پتانسیل عمل در اثر غیرفعال کردن کانال‌های سدیمی و بلوکه کردن کانال‌های پتاسیمی شده، در نتیجه باعث فلج‌شدگی و در

نهایت مرگ ماهی می‌شود (Rathmayer and Beress, 1976; Hartung and Rathmayer, 1985; Yeung et al., 2005). در این تزریق ۷۵ در صد ماهی‌ها مردند. نتایج این مطالعه با پژوهش‌های انجام گرفته درباره اثر سموم شقایق دریایی *Bunodosoma caissarum* بر روی بی‌مهرگان مانند خرچنگ *Callinectes danae* مطابقت داشت، ولی در مهره‌داران مدت زمان تأثیر سم و دز آن بیش‌تر از بی‌مهرگان است (Oliveira et al., 2006). با توجه به ارتباط مستمر و تنگاتنگ ماهی با آب، آبشش‌ها یکی از ارگان‌های بسیار حساس به عملکرد آلودگی‌ها هستند (Da Cuna et al., 2011).

در مطالعه حاضر تغییرات و آسیب‌های مختلفی در ماهی‌های تیمار شده با پپتید استخراجی از موکوس شقایق دریایی *S. haddoni* مشاهده شد که از جمله آن ناهنجاری‌ها می‌توان به جمع شدن لاملاها در ناحیه بین لاملایی، نکروز و بدشکلی انتهای لاملاها، هایپرتروفی سلول مخاطی و اپیتلیالی، ادم زیر بافت پوششی، نکروز اپیتلیالی و ریختن سلول‌ها در فضای بین لاملاها اشاره کرد. با توجه به هایپراسموتیک بودن بدن ماهی نسبت به محیط اطراف، با ورود سموم شقایق دریایی

نکروز، جداسدگی اپیتلیوم لاملا، ادم، آنوریسیم، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیالی و اتصال لاملاهای ثانویه در آبشش اشاره کرد.

مکان‌یابی پمپ سدیم-پتاسیم با استفاده از آنتی‌بادی‌ها نشان داد که آن‌ها در قسمت‌های مختلف آبشش، روی فیلامنت، ناحیه بین و پایه لاملاها و به مقدار زیادی بر روی لاملاها قرار داشتند. Witters و همکاران (۱۹۹۶) نیز گزارش کردند که یونوسیت‌ها در قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* بر روی لاملاهای اولیه، در ناحیه بین لاملایی مشاهده شدند که مطابق با قسمتی از نتایج مطالعه حاضر بود. فراوانی یونوسیت‌ها و همچنین میزان آنزیم Na^+/K^+ -ATPase روی فیلامنت و لاملاها در قزل‌آلای رنگین‌کمان به نقش مهم این سلول‌ها در حفظ اسمولاریته خون در حد هیپراسموتیک اشاره دارد و نشان می‌دهد حضور این سلول‌ها برای حفظ بقای این ماهی ضروری است.

نتایج حاصل از شمارش یونوسیت‌ها در آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در نمونه شاهد و تیمار شده با پپتید، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و تعداد آن‌ها در هر میلی‌متر مربع از برش طولی فیلامنت و لاملا حدود ۱۱۸۰ بود که این عدم تغییر تعداد یونوسیت‌ها را در

از خون به بافت آبشش، حجم زیادی از مایعات از طریق انتشار به درون این اندام وارد می‌شود که کاهش اسمولاریته پلاسما و تورم رگ‌ها این مطلب را به خوبی نشان می‌دهد. همچنین این سموم باعث کاهش حضور آنزیم Na^+/K^+ -ATPase در بچه‌ماهی قزل‌آلا شده است که در نتیجه آن، آسیب‌های مختلفی در بافت آبشش ایجاد شد. نهایتاً این تغییرات باعث از کار افتادن عملکرد تنظیم اسمزی و مرگ ماهی می‌شود. تغییرات آبششی مشاهده شده در این پژوهش با آسیب‌های گزارش شده توسط Banaee و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار گرفته در معرض سم دیازینون مطابقت داشت. هنگام قرارگیری ماهی *Chanos chanos* در معرض دینوفلاژله سمی *Alexandrium minutum* و عصاره آن، ناهنجاری‌هایی مانند ادم، هیپرپلازی و نکروز لاملاهای ثانویه در آبشش قابل مشاهده است (Chen and Chou, 2001) که با نتایج این مطالعه مطابقت داشت. همچنین نتایج مطالعه حاضر با گزارش‌های Cengiz (۲۰۰۶) بر روی ماهی *Cyprinus carpio* در هنگام قرارگیری در معرض دلتامترین مطابقت داشت که از جمله این ناهنجاری‌ها می‌توان به پوسته پوسته شدن،

کاهش در حضور آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ را می‌توان به مهار این آنزیم توسط توکسین‌های پپتیدی شقایق دریایی نسبت داد.

تزریق وریدی پپتیدهای کم‌تر از ۱۰ کیلودالتون باعث کاهش قابل توجهی در اسمولاریته پلاسما نسبت به نمونه شاهد شد که می‌تواند به علت کاهش یون‌های سدیم و کلر موجود در پلاسما باشد. یکی از دلایل کاهش یون‌های پلاسما را می‌توان به انتشار غیرفعال این یون‌ها از آبشش نسبت داد. از دیگر عوامل کاهش، می‌توان به اثر مهاری این سموم بر روی تراکم و عملکرد آنزیم سدیم-پتاسیم ATPase آبشش اشاره کرد که این آنزیم نیروی محرکه‌ای برای جذب فعال یون سدیم مورد نیاز برای همه ماهی‌های آب شیرین برای مقابله با از دست دادن این یون به صورت انتشار به محیط هیپواسموتیک اطراف است و مهار این آنزیم منجر به از دست دادن سدیم می‌شود. این نتایج مطابق با اثر تزریق داخل وریدی سم عصبی hk2a از شقایق دریایی *Anthopleura* sp. به سگ است که باعث افزایش سریع و پایدار در کاهش تخلیه بطن چپ، بدون اثر قابل توجهی در ضربان قلب می‌شود که این به علت اثر مهاری گلیکوزیدی hk2a بر روی آنزیم سدیم-پتاسیم

نمونه تیمار شده نسبت به نمونه شاهد می‌تواند با طول دوره تیمار مرتبط دانست که در کم‌تر از ۲۴ ساعت بود. در آبشش *Salmo salar*، ۱۲۰ سلول (Pelis and McCormick, 2001) و در مارماهی ژاپنی *Anguilla japonica* ۱۰۰۶ سلول (Wong and Chen, 1998) شمارش شد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مقایسه این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران به نظر می‌رسد که تعداد یونوسیت‌ها در بافت آبشش بسته به گونه ماهی، اندازه و سن ماهی، شرایط محیطی و فعالیت فیزیولوژیکی آن تغییر می‌کند.

نتایج ایمونوهیستوشیمی حضور قابل توجه آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در یونوسیت‌های آبشش را نشان داد که بر نقش تنظیم اسمزی این آنزیم در آبشش دلالت دارد. مطالعات انجام شده بر ماهی *Guppy* سازگار شده با آب دریا و آب شیرین نشان داد که نه تنها تعداد و اندازه یونوسیت‌ها در تنظیم یونی نقش دارد بلکه میزان حضور آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در این سلول‌ها نیز ضروری است (Shikano and Fujio, 1998). همچنین نتایج نشان داد که کاهش معنی‌داری در حضور آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در نمونه تزریق شده با پپتید نسبت به نمونه شاهد وجود دارد. این

اسمولاریته می‌تواند به خاطر اثر سمیت محتوای سلولی سیانوباکتری‌ها بر ماهی باشد که موجب عدم تعادل اسمزی، افزایش حجم مایع در روده و عدم توانایی در دفع آب اضافی می‌شود (Best et al., 2003) و دلیل این ناتوانایی‌ها و سرانجام مرگ ماهی را اثر مهاری این ترکیبات بر روی انواع پمپ‌های یونی دانسته‌اند (Bury et al., 1996).

پپتیدهای استخراجی کم‌تر از ۱۰ کیلودالتون از موکوس شقایق دریایی باعث ایجاد انواع آسیب‌های بافتی در آبشش، تغییر در اسمولاریته و یون‌های پلاسمای بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود که این آسیب‌ها می‌تواند عملکرد بافت آبشش (تنفسی، اسمزی، یونی و دفع مواد نیتروژنی) و سیستم‌های تنظیم یونی را مختل کند و در نهایت باعث مرگ ماهی شود.

ATPase است (Ouyang et al., 2005). از طرفی کاهش حضور آنزیم سدیم-پتاسیم ATPase را می‌توان به کاهش جذب یون کلر نسبت داد، به این علت که کوترانسپورتر NCC گرادیان یون سدیم را برای آنزیم سدیم-پتاسیم ATPase فراهم می‌آورد که نتایج حاصل از این مطالعه مطابق با اثر سمیت نقره در مهار جذب سدیم و کلر در قزل‌آلای رنگین‌کمان است (Grosell et al., 2000). از دیگر عوامل کاهش اسمولاریته می‌توان به عدم دفع آب توسط کلیه اشاره کرد که نشان دهنده تاثیر این پپتیدها بر کلیه و از کار افتادن آن است که مطابق با نتایج Gutierrez-Praena و همکاران (۲۰۱۴) در مورد اثر سمیت *Cylindrospermopsis* (سیانوباکتری) بر روی تیلاپیا بود که منجر به آتروفی گلمرول و اتساع کپسول بومن شد. علت کاهش

منابع

- Anderluh G. and Macek P. 2002.** Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*, 40: 111–124.
- Banaee M., Sureda A., Mirvagefei A. and Ahmadi K. 2013.** Histopathological alterations induced by diazinon in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Environmental Research*, 7(3): 735–744.
- Best J., Eddy F. and Codd G. 2003.** Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquatic Toxicology*, 64(4): 419–426.
- Bury N., Flik G., Eddy F. and Codd G. 1996.** The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ -ATPase in tilapia gills. *Journal of Experimental Biology*, 199(6): 1319–1326.
- Cengiz E.I. 2006.** Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2): 200–204.
- Chang S.Y. and Fang G.C. 2007.** Springtime soluble particles in a suburban area of Taichung in central Taiwan. *Atmospheric Research*, 86: 30–41.
- Chellaram C. and Edward J. 2009.** In vivo anti-inflammatory bustle of reef associated mollusc, *Trochus tentorium*. *Journal of Advanced Biotechnology*, 8(12): 32–35.
- Chen C.Y. and Chou H.N. 2001.** Ichthyotoxicity studies of milkfish *Chanos chanos* fingerlings exposed to a harmful dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262(2): 211–219.
- Da Cuna R.H., Rey Vazquez G., Piol M.N., Guerrero N.V., Maggese M.C. and Lo Nostro F.L. 2011.** Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4): 1065–1073.
- Ebada S.S., Edrada R.A., Lin W. and Proksch P. 2008.** Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3: 1820–1831.
- Frazao B., Vasconcelos V. and Antunes A. 2012.** Sea anemone

- (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An overview. *Marine Drugs*, 10(8): 1812–1851.
- Grosell M., Hogstrand C., Wood C. and Hansen H.J.M. 2000.** A nose-to-nose comparison of the physiological effects of exposure to ionic silver versus silver chloride in the European eel (*Anguilla anguilla*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 48(2): 327–342.
- Gutierrez-Praena D., Rivalde M., Pichardo S., Jos A., Moyano R., Blanco A., Vasconcelos V. and Camean A. 2014.** Histopathological and immunohistochemical analysis of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to cylindrospermopsin and the effectiveness of N-Acetylcysteine to prevent its toxic effects. *Toxicon*, 78: 18–34.
- Hartung K. and Rathmayer W. 1985.** *Anemonia sulcata* toxins modify activation and inactivation of Na currents in a crayfish neurone. *Pflügers Archiv-European journal of physiology*, 404: 119–125.
- Honma T. and Shiomi K. 2006.** Peptide toxins in sea anemones: Structural and functional aspects *Marine Biotechnology*, 8: 1–10.
- Honma T., Kawahata S., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y. and Shiomi K. 2008.** Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides*, 29(4): 536–544.
- Khodabandeh S. and Fouchereau-Peron M. 2012.** Evidence for the presence of CGRP-like molecules in the *Artemia urmiana* (Crustacean, Anostraca). Protein, (In Press).
- Khodabandeh S., Kutnic M., Aujoulat F., Charmatier G. and Charmantier-Danures M. 2005.** Ontogeny of the antennal gland in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacean, Decapoda): Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase. *Cell and Tissue Research*, 319(1): 167–174.
- Khodabandeh S., Shahriari Moghaddam M. and Abtahi B. 2009.** 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*, 11(1): 49–54.
- Khosravi S., Khodabandeh S. and Agh N. 2012.** Effects of salinity and ultraviolet radiation on bioaccumulation of mycosporines-like amino acids in *Artemia urmiana* and parthenogenetic *Artemia*. *Photochemistry and Photobiology*, 12(45): 1245–1251.
- Lin C., Tsai R. and Lee T. 2004.** Expression and distribution of Na⁺/K⁺-ATPase in gill and kidney

- of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 138(3): 287–295.
- Martoja R. and Martoja-Pierson M. 1967.** Initiation aux techniques de l histologie animale. Paris, Masson et Cie, 345P.
- Mebs D. 2009.** Chemical biology of the mutualistic relationships of sea anemones with fish and crustaceans. *Toxicon*, 54(8): 1071–1074.
- Oliveira J.S., Zaharenko A.J., Ferreira Jr W.A., Konno K., Shida C.S., Richardson M., Lucio A.D., Beirao P.S.L. and De Freitas J.C. 2006.** BcIV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BcIII. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(10): 1592–1600.
- Ouyang P., Xie J., Liu J., Xiao W., Liu Y., Wang L., Liang D., Wang Y., Xu D. and Liu Y. 2005.** Effects of a novel recombinant polypeptide from the sea anemone *Anthopleura sp.* on left ventricular function in dogs with acute cardiac insufficiency. *Di 1 jun yi da xue xue bao* (Academic journal of the first medical college of PLA), 25(1): 37–39.
- Pelis M.R. and McCormick S.D. 2001.** Effects of growth hormone and cortisol on Na-K-2Cl cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *General Comparative Endocrinology*, 124: 134–143.
- Primor N. 1985.** Pharyngeal cavity and the gills are the target organ for the repellent action of pardaxinin shark. *Experientia*, 41: 693–695.
- Rathmayer W. and Beress L. 1976.** The effect of toxins from *Anemonia sulcata* (Coelenterata) on neuromuscular transmission and nerve action potentials in crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Journal of Comparative Physiology*, 109: 373–382.
- Riguera R. 1997.** Isolating bioactive compounds from marine organisms. *Journal of Marine Biotechnology*, 5: 187–193.
- Shikano T. and Fujio Y. 1998.** Immunolocalization of in the branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and fresh water acclimation. *Experimental Biology*, 201: 3031–3040.
- Varsamos S. 2002.** Tolerance range and osmoregulation in hypersaline conditions in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*).

Journal of Marine Biology
Associate, 82: 1047–1048.

**Witters H., Berckmans P. and
Vangenechten C. 1996.**
Immunolocalization of Na^+/K^+ -
ATPase in the gill epithelium of
rainbow trout, *Oncorhynchus*
mykiss. Cell and Tissue Research,
283(3): 461–468.

Wong C.K.C. and Chan K.O. 1998.
Isolation of viable cell types from

the gill epithelium of Japanese eel
Anguilla japonica. Comparative
Physiology, 276(2): 363–372.

**Yeung S.Y., Thompson D., Wang
Z., Fedida D. and Robertson B.
2005.** Modulation of Kv3
subfamily potassium currents by
the sea anemone toxin BDS:
Significance for CNS and
biophysical studies. Journal of
Neuroscience, 25: 8735–8745.



**The effect of extracted peptides from sea anemone
Stichodactyla haddoni mucus on gill tissue, plasma osmolarity
and ions of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry**

Razieh Salehpour¹, Saber Khodabandeh^{2*}

Received: November 2014

Accepted: February 2015

Abstract

In this study, the extraction of peptides from sea anemone *Stichodactyla haddoni* mucus and their effects on the gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* were examined. For this purpose, Specimens of *S. haddoni* were collected from the intertidal coast from Hormuz Island. Frozen samples were transported to the laboratory. Then the mucus was extracted using of the PBS solvent. Peptides down of 10kDa were separated by amicon® Ultra-15 10K millipore filter device. These peptides were injected into the caudal vein of the fish and after inactivated, histopathological changes were examined using of the classical histological and immunohistochemical method and also plasma osmolarity and ions were examined in this fish. The various tissue damages of the gill were observed including hypertrophy, lamella deformation, subepithelial edema, lamella congestion in the interlamellar region and necrosis. The injection of these peptides also reduced blood plasma ions and osmolarity. The results showed that the extracted peptides from sea anemone mucus can cause numerous anomalies in the gill tissue, change in blood plasma ions and osmolarity of rainbow trout and finally resulted in failure of physiological osmoregulation function of the gills and finally led to the fish death.

Key words: *Gill, Stichodactyla haddoni, Oncorhynchus mykiss, IgG 5.*

1- M.Sc. in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.

2- Associated Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.

*Corresponding Author: surp78@gmail.com