

Histological Study and Sodium- Potassium Pump Immunolocalization in the Intestine of the Shrimp *Litopenaeus vannamei*

Zare M.¹ MSc, Khodabandeh S.^{*2} PhD, Monsef F.³ MSc, Voshtani S.S.¹ MSc

¹ Fisheries Department, Agriculture & Natural Resources Faculty, Khazar Institute for Higher Education, Mahmudabad, Iran

² Marine Biology Department, Natural Resources & Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nur, Iran

³ Marine Biology Department, Natural Resources & Marine Sciences Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran

Abstract

In the present study, 20 pieces *L. vannamei* shrimp, with average weight 5.53 ± 0.02 g were fed in 500-liter tanks with three replicates during 8 weeks. At the end, the intestines of shrimps were fixed in Bouin's solution for classic histology by hematoxylin-eosin and green light and for immunolocalization of the Na^+/K^+ -ATPase enzyme (sodium-potassium pump) by immunohistochemistry methods. The midgut epithelium was covered by simple columnar cells and nucleus position was in basal region of cells and Na^+/K^+ -ATPase enzyme observed in basal region of cells. Evaluation of rectal pad large lobes deep in foldings and distance between the lobes were observed. Lumen was observed in the middle of rectal pad and apical lobes were evident and columnar cells in the marginal in foldings with basal nucleus were observed. Small appendage called posterior diverticulum was located in primary and in upper region of rectal pad. This region was tubular and its cells with basal nucleus were observed. Rectum was located in distal region of hindgut. This region was a short muscular tube and lined with a simple columnar epithelium with low infoldings and apical nucleus in these cells were observed. The sodium-potassium pump was located in the baso-lateral area in all regions of hindgut cells. The use of hematoxylin-eosin and green light is an appropriate method to separate different parts of intestine in *vannamei* shrimp and also immunohistochemistry is a suitable method for Na^+/K^+ -ATPase enzyme localization.

Keywords

Litopenaeus vannamei [Not in MeSH];
Intestine [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68007422>];
Rectal pad [Not in MeSH];
Hematoxylin-Eosin [Not in MeSH];
Immunolocalization [Not in MeSH]

*Corresponding Author

Tel: +98 (11) 44999147

Fax: -

Post Address: Marine Biology Department, Natural Resources & Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nur, Iran. Postal code: 4641776489

surp78@gmail.com

Received: January 2, 2019

Accepted: January 28, 2019

ePublished: June 20, 2019

بافت‌شناسی و مکان‌یابی پمپ سدیم-پتاسیم در روده میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

مهیار زارع MSc

گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، موسسه آموزش عالی خزر، محمود آباد، ایران

صابر خدابنده PhD

گروه زیست دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

فریال منصف MSc

گروه زیست دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

سیدسعید وشتانی MSc

گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، موسسه آموزش عالی خزر، محمود آباد، ایران

چکیده

در مطالعه حاضر تعداد ۲۰ قطعه میگوی وانامی با میانگین وزنی 5.3 ± 0.02 گرم در تانک‌های ۵۰۰ لیتری با سه تکرار طی ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان، روده میگوها در محلول بوئن فیکس شد و به روش بافت‌شناسی کلاسیک، رنگ‌آمیزی با هماتوکسلین-آئوزین و گرین‌لایت و همچنین مکان‌یابی پمپ سدیم-پتاسیم به روش ایمنوهیستوشیمی بررسی شدند. اپی‌تلیوم روده میانی با سلول‌های استوانه‌ای ساده آستر شد و در این سلول‌ها جایگاه هسته و پمپ سدیم-پتاسیم به‌صورت قاعده‌ای مشاهده شد. بررسی بخش پیازی شکل روده انتهایی، لوب‌های بزرگ با فرورفتگی‌های عمیق و فاصله کم بین لوب‌ها را نشان داد. فضای خالی در بخش میانی ناحیه پیازی شکل در ناحیه راسی لوب‌ها مشهود بود و سلول‌های استوانه‌ای در بخش حاشیه‌ای این فرورفتگی‌ها با هسته‌های قاعده‌ای مشاهده شدند. زائده توخالی کوچکی به نام پوستریور دایورتیکولوم در بخش ابتدایی و قسمت فوقانی رکتال‌پد قرار داشت که به‌صورت لوله‌ای بود و سلول‌های آن با هسته‌های قاعده‌ای آشکار بودند. رکتوم در بخش انتهایی روده به‌صورت لوله‌ای کوتاه و با اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده با فرورفتگی‌هایی با عمق کم آستر شده بود و هسته در این سلول‌ها به‌صورت میانی مشاهده شد. جایگاه پمپ سدیم-پتاسیم در تمام روده انتهایی به‌صورت قاعده‌ای-جانبی مشاهده شد. نتایج نشان داد که استفاده همزمان هماتوکسلین-آئوزین و گرین‌لایت روش مناسبی برای تفکیک بخش‌های مختلف روده در میگوی وانامی و همچنین روش ایمنوهیستوشیمی روش مناسبی برای مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ است.

کلیدواژه‌ها: *Litopenaeus vannamei*، روده، رکتال‌پد، هماتوکسلین-آئوزین، مکان‌یابی پمپ سدیم-پتاسیم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۸

*نویسنده مسئول: surp78@gmail.com

مقدمه

میگوی وانامی با نام علمی *Litopenaeus vannamei* به‌طور طبیعی در طول سواحل اقیانوس آرام مرکزی و شمالی گسترش پیدا کرده است و به‌طور گسترده‌ای به‌منظور تولید غذا در بسیاری از کشورها به‌صورت مصنوعی پرورش داده می‌شود^[1,2]. این گونه در

مناطق که درجه حرارت آب در طول سال به‌طور معمول بیشتر از 20°C است، در زیستگاه‌های دریایی گرمسیری زندگی می‌کند. بالغین در اقیانوس باز زندگی و تخم‌ریزی می‌کنند، در حالی که پست‌لاروها با مهاجرت به نزدیک ساحل، مراحل نوجوانی، بلوغ اولیه و پیش‌بلوغ خود را در مصب‌های ساحلی، تالاب‌ها و مناطق حرا می‌گذرانند^[3]. با توجه به اینکه میگوی وانامی از سال ۲۰۰۳ جایگزین سایر گونه‌های پرورشی شده است^[4]، شناخت بافت طبیعی روده و شناخت ساختار روده تحت تاثیر فاکتورهای محیطی، انواع غذاها، آلاینده‌ها و غیره ضروری به نظر می‌رسد.

به‌طور عمومی دستگاه گوارش میگوها از سه بخش ابتدایی، میانی و انتهایی تشکیل شده است^[5]. عمل اصلی روده ابتدایی، ترشح آنزیم‌های گوارشی است. روده میانی، لوله‌ای است که فرورفتگی دارد و به‌طور پیوسته از پشت سفالوتراکس در سراسر بندهای شکمی تا مخرج امتداد پیدا می‌کند^[5,6] و فرورفتگی‌های آن با اپی‌تلیوم ساده آستر شده است^[5-8]. روده انتهایی (رکتوم)، ماهیچه‌ای و کوتاه و دارای برجستگی زائده‌شکل شش‌تایی است که با اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده آستر شده است^[5,7]. این بخش در ده‌پایان در نیمه انتهایی بند ششم شکمی واقع شده و شامل راست‌روده و مخرج است. معمولاً در آن بند یک غده بیضی‌شکل یا رکتال‌پد (Rectal pad) وجود دارد که تا فضای روده میانی امتداد یافته است که به‌صورت پشتی واقع شده و دارای اپی‌تلیوم فرو رفته است. بخش دیستال این غده در امتداد روده انتهایی قرار دارد. ساختار ویژه‌ای که در میگوهای خانواده پنائیده دیده می‌شود عبارت است از دو کانال به‌صورت موازی که در فضای رکتوم وجود دارد و به رکتوم متصل می‌شود و در یک کانال مشترک به هم متصل می‌شوند. رکتوم دارای قطر کم است و بین تلسون و اوروپدها در مخرج به بیرون گشوده می‌شود. در پنائیده‌ها روده انتهایی از غده راست‌روده که در ناحیه پشتی واقع شده است آغاز می‌شود و از رکتوم و کانال مخرج تشکیل می‌شود^[6]. جذب آب در این بخش از قطعه گوارش به فشرده‌شدن و انتقال مدفوع کمک می‌کند. طبق گزارشات، بخش‌های میانی و انتهایی روده سخت‌پوستان در فرآیند تنظیم اسمزی نقش دارند^[9]. از طرفی مکان‌یابی پمپ سدیم-پتاسیم با استفاده از آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در روده لابستر (*Homarus gammarus*) که نسبت به محیط خود هیپواسمیتیک و ساکن آب شور است، نشان می‌دهد که جایگاه این پمپ به‌صورت بازولترال است و در تنظیم اسمزی نقش دارد^[10]. به‌طور کلی در آبزیان سلول‌های دخیل در تنظیم فشار اسمزی یونوسیت (سلول‌های غنی از میتوکندری یا کلراید) هستند که با مجهزبودن به تراکم بالای پمپ سدیم-پتاسیم قادر به جابه‌جایی یون‌ها برخلاف جهت شیب غلظت (یعنی به طریق انتقال فعال) هستند. این پمپ معمولاً در تمام سلول‌های بدن وجود دارد و کنترل حجم سلول‌ها یکی از مهمترین اعمال آن است^[11]. تراکم بالای این پمپ در سلول‌های یونوسیت مسئول حفظ اختلاف غلظت سدیم و پتاسیم در دو طرف غشای سلول است و ضمناً پتانسیل منفی درون سلول را برقرار

مطالعات ایمونوهیستوشیمی تا مرحله تهیه برش مانند روش بافت‌شناسی کلاسیک بود، اما در ادامه لام‌های تهیه‌شده توسط گزینن پارافین‌زدایی شدند و به ترتیب با سری اتانول‌های ۱۰۰، ۹۵، ۹۰، ۷۰ و ۵۰٪ آب‌دهی شدند. سپس به ترتیب ۲ دقیقه در محلول بافر فسفات‌سالین (PBS) در آون در دمای ۳۷°C، ۱۰ دقیقه در محلول S2 (۲۰۰ سی‌سی محلول PBS و ۱/۷۵ گرم سدیم برابر ۵/۰ میلی‌مول به خوبی حل و در زمان استفاده ۴۰ میکرولیتر از شوینده توبین ریخته و pH را به ۷/۳ رسانده شد)، سپس ۲۰ دقیقه در محلول S3 یا به عبارتی ۲۰۰ سی‌سی محلول PBS و ۱۰ گرم شیر خشک (Regiler) قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول PBS شست‌وشو داده شد. در مرحله بعد برای مکان‌یابی پمپ Na^+/K^+ -ATPase از آنتی‌بادی IgGα5 استفاده و سپس ۲-۳ قطره از آنتی‌بادی FITC روی هر لام اضافه شد و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک قرار داده شدند [13, 14, 18].

در پایان لام‌های ایمونوشده به ترتیب از محلول PBS خارج و با چسب مخصوص ایمونوهیستوشیمی لامل‌گذاری روی آنها انجام و لام‌ها با میکروسکوپ نوری فلئوئورسانس با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر بررسی و عکس‌برداری از آنها با دوربین Olympus DP72 انجام شد [10, 12, 13]. ضخامت اپی‌تلیال نیز به وسیله نرم‌افزار Image J 7 انجام اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

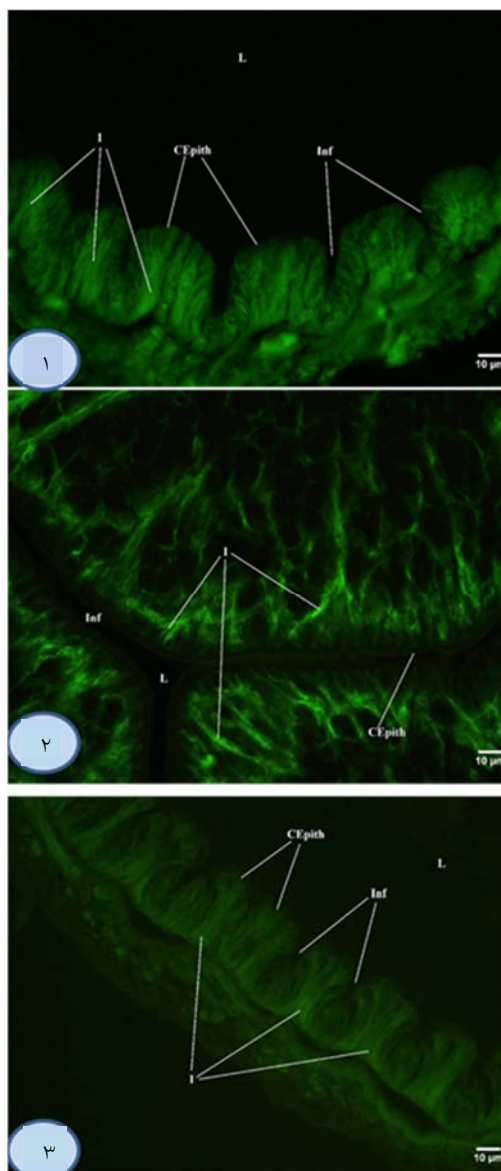
نتایج حاصل از مطالعه بخش میانی و انتهایی روده نشان داد که بخش میانی دارای اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده و جداره داخلی آن کاملاً با سلول‌های استوانه‌ای ساده آستر شده است. هسته‌ها در این ناحیه گرد بودند و در این سلول‌ها به صورت قاعده‌ای مشاهده شدند. در برش عرضی نمونه‌ها، ماهیچه‌های طولی و فرورفتگی‌های طولی دیده شد که دارای عمق زیاد بودند (شکل ۱-۱). دیواره خارجی روده میانی با لایه‌ای از بافت پیوندی آستر شده بود (شکل ۱-۱) و ناحیه پیازی شکل بخش انتهایی روده که در ابتدای این بخش قرار گرفته است، ظاهری پیازی شکل دارد و به سه بخش ابتدایی، میانی و انتهایی تقسیم می‌شود (شکل‌های ۲-۱، ۳-۱ و ۴-۱). بخش ابتدایی و انتهایی نسبت به بخش میانی، دارای فضای خالی بزرگتری هستند و همچنین فاصله بین حاشیه لوب‌ها در محل فرورفتگی‌ها بیشتر است (شکل‌های ۲-۲ و ۴-۲). فرورفتگی لوب‌ها در نواحی ابتدایی و انتهایی برخلاف بخش میانی کم است و نواحی راسی لوب‌ها در این دو بخش برخلاف بخش میانی از یکدیگر فاصله دارند و به صورت درهم‌رفته مشاهده نمی‌شوند (شکل‌های ۲-۲ و ۴-۲)، اما بخش میانی ناحیه پیازی شکل، دارای لوب‌های بزرگ همراه با فرورفتگی‌های عمیق، با فاصله کم بین حاشیه لوب‌ها در محل فرورفتگی‌ها است و فضای خالی کوچکی در ناحیه راسی لوب‌های این بخش مشاهده شد. نواحی راسی لوب‌ها در داخل فضای خالی به صورت درهم‌رفته با فاصله کم قابل رویت هستند (شکل ۳-۱). بخش حاشیه‌ای لوب‌ها در هر سه بخش سلول‌های استوانه‌ای ساده‌ای دارد و هسته این

می‌کند. همچنین حضور غلظت بالایی از آنزیم Na^+/K^+ -ATPase در انتروسیت‌های روده بیانگر نقش اصلی این پمپ در جذب مواد غذایی در کنار نقش تنظیم یونی آن است [12]. همچنین این آنزیم در لوله‌های مالپیگی حشرات آبی گزارش شده است [13]. به طور کلی تحقیقات نشان داده است که آنزیم Na^+/K^+ -ATPase نقش محوری در انتقال یونی سلول‌های یونوسیت ایفا می‌کند و مکان‌یابی این آنزیم با استفاده از آنتی‌بادی IgGα5 و FITC و میکروسکوپ نوری فلئوئورسانس امکان‌پذیر است [12, 14].

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در اواخر مرداد سال ۱۳۹۱ در کارگاه تکثیر و پرورش میگوی گمشان در استان گلستان انجام شد. میگوهای وانامی از مزرعه‌های شماره ۱۲ و ۱۳ شرکت کاسپین کیان‌پارس (جهاد نصر حمزه) مجتمع میگوی گمشان با شوری ۲۶ppt به کارگاه منتقل شدند و پس از یک هفته سازش‌دادن به محیط آزمایشگاهی، نمونه‌هایی با میانگین وزنی $5/0 \pm 0/05$ گرم در تانک‌های ۵۰۰ لیتری (با سطح مقطع تقریباً یک متر مربع) با سه تکرار ذخیره‌سازی شدند. هر تانک حاوی ۲۰ قطعه میگوی وانامی بود و در محیطی با میانگین دمای آب $27/39 \pm 1/36^\circ\text{C}$ ، $\text{pH} = 8/21 \pm 0/60$ ، شوری برابر با $33/77 \pm 0/60$ ppt و اکسیژن محلول برابر با $8/05 \pm 0/32$ ppm طی ۸ هفته، سه بار در روز در ساعات ۸، ۱۶ و ۲۲ با غذای ۴۰۳ (هووراش، ایران) تغذیه شدند. فاکتورهای کیفی آب مانند دما به صورت روزانه (صبح و عصر) و pH، شوری و اکسیژن محلول به صورت هفتگی اندازه‌گیری شدند. مدفوع و غذای اضافی تانک‌ها روزانه سیفون شدند و سپس ۱۵ تا ۲۰٪ آب هر تانک به صورت روزانه تعویض شد. پس از پایان دوره میگوها به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا شدند و سپس تعداد پنج نمونه میگو از هر تانک به وسیله ساچوک صید و پس از جداکردن روده و شست‌وشو با سرم فیزیولوژیک، روده به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن فیکس شد [10]. پس از پایان ۲۴ ساعت، به منظور آب‌گیری و نگهداری نمونه‌ها محلول بوئن با الکل ۷۰٪ جایگزین شد و طی یک هفته این کار دو بار تکرار شد تا رنگ زرد بوئن کاملاً از بین برود. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و پروسه آب‌گیری با الکل ۹۰، ۱۰۰ و بوتانول [15-17] و عمل شفاف‌سازی با گزینن انجام شد و در نهایت نمونه‌ها پس از نگهداری در پارافین مایع به مدت ۱۸ ساعت در آون با دمای 60°C قالب‌گیری شدند. سپس از نمونه‌ها بلوک تهیه شد و با استفاده از دستگاه میکروتوم مدل Microds 4055 (Microtec؛ آلمان) برش‌های ۵-۳ میکرومتری ایجاد شدند. برش‌ها روی لام چسبانده و در آون با درجه حرارت 37°C نگهداری شدند [15]. سپس رنگ‌آمیزی لام‌ها به شیوه هماتوکسیلین-اتوزین و گرین‌لایت انجام شد و لام‌ها با میکروسکوپ نوری مدل Nikon 3200 مورد بررسی قرار گرفتند و عکس‌برداری از آنها با دوربین مدل Olympus DP72 و با عدسی‌های ۵، ۱۰ و ۴۰ انجام شد [12, 15-17]. آنزیم Na^+/K^+ -ATPase نیز با روش ایمونوهیستوشیمی مکان‌یابی شدند.

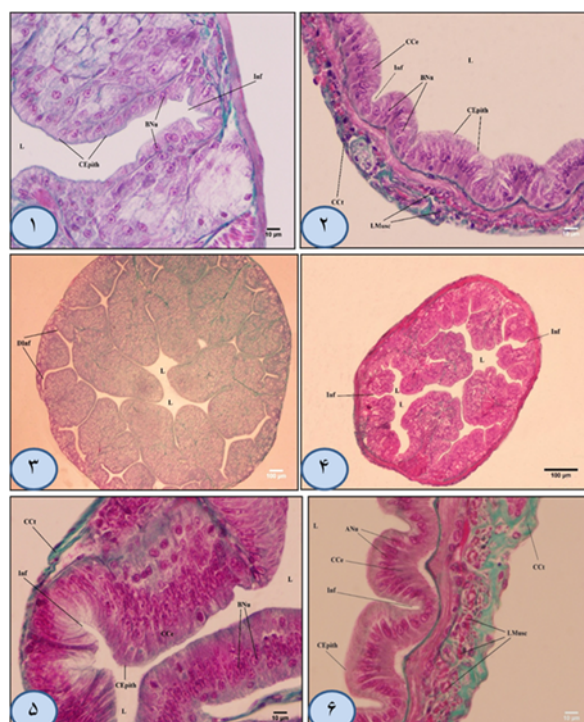
ATPase در رکتوم نیز جایگاه پمپ را به صورت قاعده‌ای- جانبی نشان داد (شکل ۲-۳).



شکل ۲ مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (پمپ سدیم- پتاسیم) در برش عرضی روده میگوی وانامی؛ روده میانی (۱)؛ رکتال پد (۲)؛ برش رکتوم (۳)

مطالعه بخش میانی و انتهایی روده دستگاه گوارش میگوی وانامی در مطالعه حاضر نشان داد که بخش میانی دارای اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده است. رکتال پد با ظاهری پیازی‌شکل و در ابتدای روده انتهایی قرار گرفته و به سه بخش ابتدایی، میانی و انتهایی تقسیم شده و با سلول‌های استوانه‌ای ساده آستر شده است. بررسی این بخش نشان داد که زائده کوچکی با انتهای کور به نام پوسترپور دایورتیکولوم یا زائده کور پسین در بخش ابتدایی و ناحیه فوقانی بخش پیازی‌شکل قرار دارد که حاصل امتداد روده میانی است. این ناحیه به صورت توبولار و فضاهای خالی متعدد به وضوح در آن قابل مشاهده بود. رکتوم بخش انتهایی دستگاه گوارش و ماهیچه‌ای بود و با اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده با فرورفتگی‌هایی با عمق کم آستر

سلول‌ها گرد است و جایگاه هسته به صورت قاعده‌ای مشاهده شد. زائده کوچک توخالی انتهایی با انتهای کور (Posterior diverticulum) حاصل از امتداد روده میانی است و در بخش ابتدایی و ناحیه فوقانی ناحیه پیازی‌شکل قرار دارد. این ناحیه به صورت توبولار بود و فضاهای خالی متعددی به وضوح مشاهده شدند و بافت پیوندی در فضای بین توبول‌ها نیز دیده شد. دیواره داخلی این فضاهای خالی با سلول‌های استوانه‌ای ساده طویل با چین‌خوردگی‌هایی با عمق کم آستر شده بود. سلول‌ها به صورت فشرده و متراکم با هسته‌های گرد و یا بیضی‌شکل با جایگاه قاعده‌ای مشاهده شدند (شکل ۱-۵). رکتوم که بخش انتهایی دستگاه گوارش و روده انتهایی است، لوله‌ای‌شکل و ماهیچه‌ای بود و با اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده با فرورفتگی‌هایی با عمق کم با ضخامت ۶۷ میکرومتر آستر شده بود. هسته‌های گرد و یا در برخی مواقع بیضی‌شکل با جایگاه قاعده‌ای در سلول‌ها قابل رویت بود. دیواره خارجی رکتوم توسط بافت پیوندی پوشیده شده بود (شکل ۱-۶).



شکل ۱ برش عرضی روده میگوی وانامی (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- اتوزین و گرین‌لایت؛ روده میانی (۱)؛ بخش ابتدایی، بخش میانی و بخش انتهایی ناحیه پیازی‌شکل روده انتهایی به ترتیب (۲)، (۳) و (۴)؛ برش یک زائده کور (۵)؛ برش رکتوم (۶)

همچنین مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در بخش‌های مختلف روده میانی و روده انتهایی نشان داد که سلول‌های این بخش‌های روده ایمنوفلوئورسنت هستند و تراکم بالایی از این آنزیم را دارند. جایگاه آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در سلول‌های روده میانی به صورت قاعده‌ای- جانبی بود (شکل ۱-۲) و تمام حاشیه لوب‌ها در هر سه بخش ناحیه پیازی‌شکل فلوروسنت به صورت قاعده‌ای- جانبی مشاهده شد (شکل ۲-۲). مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$

لوله‌ای ساده است که از بندهای شکمی آغاز شده و تا مخرج امتداد یافته است. همچنین ضخامت دیواره ماهیچه‌ای روده انتهایی در داخل از ردیف‌های برجسته طولی شش‌تایی تشکیل شده است که تا داخل لومن امتداد می‌یابد و با سلول‌های استوانه‌ای ساده آستر شده است. این مشاهدات با مشاهدات قبلی روی خرچنگ گرد همخوانی دارد [7]. در مطالعه دیگری سلول‌های بافت پوششی در بخش میانی دستگاه گوارش *Pinnotheres cyclinus* به صورت استوانه‌ای گزارش شده است و تعداد زیادی میکروویلی در سطح لومینال مشاهده می‌شود و یک هسته کروی و یا بیضی‌شکل نیز در مرکز سلول قرار گرفته است [23]. سلول‌های کولومار ساده آستر شده و دارای فرورفتگی‌های طولی در روده *Homarus gammarus* گزارش شده است [10].

علاوه بر اهمیت روده به عنوان جذب‌کننده مواد مغذی مورد نیاز بدن، با توجه به اهمیت آن در تنظیم یونی، ساختار آن و تغییرات اندازه انتروسیت‌ها در سخت‌پوستان مختلف و در محیط‌هایی با شوری‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است. در خرچنگ *Chasmagnathus granulata* که در مصب زیست با شوری ۲ppt زندگی می‌کند. ناحیه روده میانی با لایه‌ای از سلول‌های استوانه‌ای ساده باریک و طولی به ارتفاع ۸۰-۱۰۰ میکرومتر آستر شده و در نوک خود دارای میکروویلی نازک است و روده انتهایی آن با سلول‌های استوانه‌ای به ارتفاع ۶۰ میکرومتر و دارای یک لایه کوتیکولی با ضخامت ۱۰ میکرومتر گزارش شده است. سلول‌های بافت پوششی در خرچنگ *Dilocarcinus pagei* که هایپراسموتیک (ساکن آب شیرین) و به صورت استوانه‌ای ساده است و ضخامتی برابر با ۱۰۰-۲۰۰ میکرومتر دارد. همچنین سلول‌های بخش روده انتهایی این خرچنگ استوانه‌ای با ارتفاع ۴۰ میکرومتر است [9]. پمپ سدیم دارای آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ نیروی لازم برای انتقال یون‌های تک ظرفیتی را در آبشش‌ها و سایر بافت‌های انتقال‌دهنده در بسیاری از حیوانات از جمله سخت‌پوستان فراهم می‌کند [24]. فرآیند تنظیم اسمزی براساس توانایی تبادلات یونی (اساساً Na^+ و Cl^-) و افزایش سطح فعالیت $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ است. اپی‌تلیومی که در تنظیم اسمزی نقش دارد و این نقش در دوره‌های مختلف رشد در نقاط مختلف از جمله محفظه آبششی سخت‌پوستان حضور دارد [25].

در مطالعه حاضر ضخامت اپی‌تلیوم روده میانی و رکتوم در میگوی وانامی به ترتیب ۶۹ و ۶۷ میکرومتر اندازه‌گیری شد. همچنین مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در بخش‌های مختلف روده میانی و روده انتهایی نشان داد که جایگاه پمپ سدیم-پتاسیم در روده میانی به صورت قاعده‌ای است و تمام حاشیه لوب‌ها در ناحیه پیازی شکل به صورت قاعده‌ای- جانبی مشاهده شد. مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در رکتوم جایگاه پمپ را نیز به صورت قاعده‌ای- جانبی نشان داد. حضور آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ در روده میانی و روده انتهایی با فلئورسانس بالا، بیان‌کننده نقش موثر بخش‌های مختلف روده در فرآیند تنظیم اسمزی (قابلیت تبادلات یونی و آب)

شده بود. مطالعات ساختار دستگاه گوارش ده‌پایان از سال‌ها پیش مورد توجه محققین بوده است. این مطالعات بیان کرده‌اند که آناتومی ترکیب سلولی در دستگاه گوارش سخت‌پوستان دپا از بسیاری جنبه‌ها با سیستم مهره‌داران تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد. همچنین بخش میانی دستگاه گوارش این سخت‌پوستان شامل لوله میانی، زوائد کور پیشین و پسین و هیپاتوپانکراس است و بخش میانی لوله گوارش می‌تواند طولی (مانند پنائیده‌ها) و یا کوتاه (مانند خرچنگ دراز آب شیرین) باشد [19]. در برخی مطالعات اشاره شده بود که روده میانی لوله‌ای و دارای یک نوع سلول استوانه‌ای با لایه کوتیکولی آستر نشده است و سلول‌های اپی‌تلیال مستقیماً در تماس با فضای خالی هستند [19]. در مطالعه حاضر نیز این ساختار تایید شد. در برخی مطالعات دیگر به نقش روده میانی در جذب آب و یون [20] و همچنین نقش در ترشح آنزیم‌های گوارشی و جذب مواد مغذی اشاره شده است [5]. مشاهدات برش‌های میکروسکوپ نوری و الکترونی زوائد توخالی بخش پیشین روده میانی در دستگاه گوارش مربوط به *Penaeus monodon* نشان داده است که هر لایه اپی‌تلیوم اساساً شامل یک لایه از سلول استوانه‌ای است و یک لبه دارای میکروویلی در سطح لومینال دارد [21]. در مطالعه حاضر مشخص شد که بخش لوله‌ای راست از ناحیه پشتی سفالوتراکس، در بین بندهای شکمی تا رکتوم امتداد پیدا کرده و فضای خالی یک‌سوم ابتدایی روده انتهایی، بسیار بزرگتر از فضای خالی یک‌سوم انتهایی این بخش از روده انتهایی و اشکال موکوسی فرورفتگی‌های داخلی است. رکتوم قطر کمی داشت و در بین تلسون و اروپدیت‌ها در ناحیه مخرج به بیرون گشوده می‌شد. در مطالعات پیشین گزارش شده بود که در پنائیده‌ها، بخش انتهایی دستگاه گوارش از غده رکتال منشا گرفته است که جایگاه پشتی دارد و رکتوم و کانال مخرج را شامل می‌شود [6].

ویژگی‌های چشمگیر روده انتهایی در ده‌پایان به دلیل وجود پوسته کوتیکولی و گروه‌های خارها است و در حرکت مدفوع به سمت مخرج تاثیر دارد [22]. در مطالعه دیگری روی میگوی *Litopenaeus vannamei* مشخص شد که جداره داخلی روده میانی با اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده آستر شده و دارای فرورفتگی است [5]. بررسی‌های روده انتهایی در مطالعه حاضر نشان داد که رکتوم ماهیچه‌ای و کوتاه است و با برجستگی‌های شش‌تایی و با سلول‌های استوانه‌ای ساده آستر شده است. همچنین بررسی تصاویر زوائد تو خالی بخش انتهایی روده میانی و زوائد تو خالی بخش ابتدایی روده میانی یا آنتریور دایورتیکولوم نشان داد که این بخش‌ها از توسعه بخش میانی ایجاد می‌شوند. در مطالعه د/ و همکاران نیز اشاره شده است که این بخش‌ها اندامی فشرده و دارای توپول‌های متعددی هستند و هر توپول یک دیواره با اپی‌تلیوم ساده با یک فضای میکروویلولوزیته و بافت پیوندی نازک، با بافت ماهیچه‌ای صاف پوشیده شده است که این بافت ماهیچه‌ای در مجاورت آن به صورت جداگانه قابل رویت است [5].

در مطالعه حاضر آنالیز شکل‌های روده میانی نشان داد که این بخش

گفت که حضور پمپ سدیم- پتاسیم در این قسمت دستگاه گوارش زمینه را برای جذب مواد مغذی و یون‌ها آماده می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که استفاده همزمان هماتوکسلین- ائوزین و گرین‌لایت روش مناسبی برای تفکیک بخش‌های مختلف روده در میگوی وانامی است. این اندام ساختار لوله‌ای با فرورفتگی‌های طولی دارد و دو بخش روده میانی و روده انتهایی با اپیتلیوم استوانه‌ای ساده آستر شده‌اند. همچنین مکان‌یابی آنزیم Na^+/K^+ ATPase می‌تواند به‌عنوان شاخص حضور پمپ سدیم- پتاسیم و تاییدکننده نقش تنظیم یونی این بخش روده در کنار نقش جذب مواد مغذی باشد.

تشکر و قدردانی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان مطالعه حاضر وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مهباز زارع (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)، صابر خداینده (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)، فریال منصف (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ سیدسعید وشتانی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۵٪)

منابع مالی: این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- 1- Chang YP, Liu CH, Wu CC, Chiang CM, Lian JL, Hsieh SL. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol*. 2012;32(2):284-90.
- 2- Walker PJ, Mohan CV. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: Origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Rev Aquac*. 2009;1(2):125-54.
- 3- FAO.org [Internet]. Rome: FAO; 2013 [cited 2007 June 20]. Available from: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en.
- 4- FAO.org [Internet]. Rome: FAO; 2005 [cited 2005 July 25]. Available from: http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=collection&xml=global-production.xml&xp_nav=1.
- 5- Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Sharples DJ. The biology of the Penaeidae. Cambridge: Academic Press; 1990.
- 6- Ceccaldi HJ. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared decapods reared in aquaculture. *Adv Trop Aquac*. 1989;9:243-59.
- 7- Jantrarat P, Srakaew N, Sawanyatiputi A. Histological study on the development of digestive system in zoal stages of mud crab (*Scylla olivacea*). *Ksetsart J*. 2005;39:666-71.
- 8- Mykles DL. The ultrastructure of the posterior midgut caecum of *Pachygrapsus crassipes* (Decapoda,

است. از مدت‌ها پیش به این نکته اشاره شده است که اگرچه آبشش‌ها نخستین محل برای تبادلات یونی در ده‌پایان است، اما دستگاه گوارش عملکرد چندمنظوره در ایجاد تعادل در میزان یون و آب در گروه سخت‌پوستان ایفا می‌کند [26]. توانایی تبادلات یونی در اپیتلیال روده معروف و در بسیاری از حیوانات فقط سطح اپیتلیال روده برای جذب آب و یون موثر است و دستگاه گوارش سخت‌پوستان علاوه بر هضم و جذب مواد مغذی، در تنظیم اسمزی- یونی نیز شرکت دارد [9]. معمولاً بافت پوششی منتقل‌کننده لیه دندان‌ه مسواکی گسترده است و فرورفتگی‌های چشمگیر در لامینای قاعده‌ای با تعداد زیادی میتوکندری به‌صورت متراکم را دارد [27]. بررسی فراساختار دستگاه گوارشی و ناحیه روده میانی طی دوره رشد جنینی در *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) نشان داده است که نواحی روده ابتدایی و روده انتهایی در مرحله پس از جنینی در فرآیند جذب و تبادلات نقش دارند [28]. طبق بررسی‌ها می‌توان گفت شاید روده انتهایی در انتقال مواد زائد به خارج و تبادلات یونی نیز نقش داشته باشد [20] و ظاهراً اعمال اصلی شامل شکل‌دادن به غشای تغذیه‌ای، کار سفت‌کردن مدفوع و جذب آب طی چرخه پوست‌اندازی را بر عهده دارد [19]. اگرچه مطالعات ساختاری متعددی روی دستگاه گوارش سخت‌پوستان انجام شده، اما در اکثر آنها براساس نوع ساختار و فراساختار سلولی به نقش تنظیم آب و یون در قسمت‌های مختلف روده اشاره شده است. اما در ده سال گذشته مطالعات فراساختاری و خصوصاً ایمنوهیستوشیمی سبب تایید فرضیه‌ها در خصوص نقش تنظیم یونی روده در سخت‌پوستان شده است. سخت‌پوستان در زیستگاه‌هایی با شوری‌های ثابت و دارای تغییر با مکانیزم‌های مختلف تنظیم اسمزی با فعالیت سلول‌های ویژه که در بافت‌های مختلف قرار دارد سازگار شده‌اند [14]. همچنین مکان‌یابی پمپ Na^+/K^+ -ATPase در دستگاه گوارش *Ischnura elegans* و *Libellula lydia* نشان داد که میزان حضور آنزیم Na^+/K^+ -ATPase در ناحیه روده انتهایی در هر دو گونه بیشتر از روده ابتدایی و روده میانی است و هیچ اثری از حضور پمپ سدیم- پتاسیم در روده ابتدایی و یا میانی مشاهده نشد [13]. بنابراین در مطالعه فوق اشاره شد که روده انتهایی نقش مهمی در تنظیم اسمزی این بی‌مهرگان آبی دارد. همچنین آنزیم Na^+/K^+ -ATPase در توبول‌های مالپیگی و بافت پوششی رکتال‌پد در *Ischnura elegans* و در بافت پوششی لایه‌های قاعده‌ای لامینای آبششی رکتال در *Libellula lydia* گزارش شده است و واکنش ایمنیایی واضح و به‌هم‌پیوسته در کناره‌های فضای خالی در سلول‌های لوله‌های مالپیگی و همچنین فلوتورسانس قوی به‌صورت بازولترال در لایه سلول‌های بافت پوششی مشاهده شد [13]. با توجه به نتایج تحقیقات پیشین و نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که ساختار سلولی روده میانی و خصوصاً روده انتهایی در میگوی وانامی نشانگر این است که این اندام در کنار نقش جذب مواد مغذی می‌تواند نقش مهمی در تنظیم یون داشته باشد و همچنین می‌توان

- Tissue Research. 2005;319(1):167-74.
- 18- Lignot JH, Charmantier-Daures M, Charmantier G. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase in the organs of the branchial cavity of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). Cell Tissue Res. 1999;296(2):417-26.
 - 19- Vogt G. Morphology and physiology of digestive epithelia in Decapod crustaceans. Pflügers Archiv. 1996;431(6):R239-40.
 - 20- Icely JD, Nott JA. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. In: Harrison FW, Humes AG, editors. Microscopic anatomy of invertebrates, Decapoda Crustacea. Hoboken: Wiley; 1992. pp: 147-201.
 - 21- Abubakr MA, Jones DA. Functional morphology and ultrastructure of the anterior mid-gut diverticulae of larvae of *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (Decapoda, Natantia). Crustaceana. 1992;62(2):142-58.
 - 22- Felgenhauer BE. Internal anatomy of the Decapoda: An overview. In: Harrison FW, Humes AG, editors. Microscopic anatomy of invertebrates, Decapod Crustacea. Hoboken: Wiley; 1992. pp. 45-75.
 - 23- Moon YW, Kim HH. Morphological study of the digestive tract of the mud crab (*Hemigrapsus penicillatus* De Haan) and the symbiotic crab (*Pinnotheres cyclinus* Shen). Korean J Biol Sci. 1999;3(4):407-12.
 - 24- Lucu Č, Towle DW. Na⁺ K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol. 2003;135(2):195-214.
 - 25- Charmantier GU. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: A review. Invertebr Reprod Dev. 1998;33(2-3):177-90.
 - 26- Mykles DL. Ultrastructure of alimentary epithelia of lobsters, *Homarus americanus* and *H. gammarus*, and crab, *Cancer magister*. Zoomorphologie. 1979;92(3):201-15.
 - 27- Felder DL, Felgenhauer BE. Morphology of the midgut-hindgut juncture in the ghost shrimp *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt) (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea). Acta Zoologica. 1993;74(4):263-76.
 - 28- Štrus J, Klepal W, Repina J, Tušek-Žnidarič M, Milatović M, Pipan Ž. Ultrastructure of the digestive system and the fate of midgut during embryonic development in *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Arthropod Struct Dev. 2008;37(4):287-98.
 - Brachyura) adapted to low salinity. Tissue Cell. 1977;9(4):681-91.
 - 9- McNamara JC, Zanotto FP, Onken H. Adaptation to hypoosmotic challenge in brachyuran crabs: A microanatomical and electrophysiological characterization of the intestinal epithelia. J Exp Zool Part A Comp Exp Biol. 2005;303A(10):880-93.
 - 10- Khodabandeh S, Charmantier G, Charmantier-Daures M. Immunolocalization of in osmoregulatory organs during the embryonic and post-embryonic development of the lobster *Homarus gammarus*. J Crustacean Biol. 2006;26(4):515-23.
 - 11- Anderson E, Beams HW, Press N. Light and electron microscopic studies on the cells of the labyrinth in the green gland of *Cambarus* sp. In: Iowa Academy of Science. The proceedings of the Iowa academy of science. 63th Volume. Cedar Falls: Iowa Academy of Science; 1956. pp. 681-5.
 - 12- Khodabandeh S, Khoshnood Z, Mosafer S. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. Aquac Res. 2009;40(3):329-36.
 - 13- Khodabandeh S. Na⁺, K⁺-ATPase in the gut of larvae of the Zygopteran, *Ischnura elegans*, and the Anisoptera, *Libellula lydia*, (Odonata): Activity and immunocytochemical localization. Zool Stud. 2006;45:510-6.
 - 14- Charmantier G, Haond CH, Lignot J, Charmantier-Daures MI. Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: A review in homarid lobsters. J Exp Biol. 2001;204(5):967-77.
 - 15- Khodabandeh S, Charmantier G, Charmantier-Daures M. Ultrastructural studies and Na⁺, K⁺-ATPase immunolocalization in the antennal urinary glands of the lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). J Histochem Cytochem. 2005;53(10):1203-14.
 - 16- Khodabandeh S, Charmantier G, Blasco C, Grousset E, Charmantier-Daures M. Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): Anatomical and cell differentiation. Cell Tissue Res. 2005;319(1):153-65.
 - 17- Khodabandeh S, Kutnik M, Aujoulat F, Charmantier G, Charmantier-Daures M. Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase. Cell