بافت‌شناسی و مکان‌یابی ایمنیایی سلول‌های یونوسیت در آبشش بچه ماهی هامور معمولی *(Epinephelus coioides)*

محمدرضا پورخواجه[۱]، رحیم عبدی[۲*]، حسین ذوالقرنین[۳]، همایون حسین‌زاده صحافی[۴]، حسن مروتی[۵]

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: poorkhadjemr@yahoo.com

۲ـ استادیار بخش بافت شناسی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: abdir@kmsu.ac.ir

۳ـ استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: zolgharnine@kmsu.ac.ir

۴ـ استادیار موسسه تحقیقات شیلات ایران، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: h_hosseinzadeh@yahoo.com

۵ـ دانشیار بخش بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: hmorovvati@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: بهمن ۸۹ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۰*

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۰، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

به‌منظور مطالعه بافت‌شناسی آبشش نمونه‌های مورد نظر پس از تهیه در فیکساتیو بوئن فیکس شده و بعد از آبگیری در اتانول، پارافینه شدند. در مرحله بعدی برش‌هایی از بلوک‌ها به‌ضخامت ۵ میکرون تهیه شد و برای مطالعه بافت‌شناسی از رنگ‌آمیزی H&E استفاده گردید. آنگاه فتومیکروگراف‌های لازم با استفاده از ده میدان میکروسکوپی نوری آماده گردید. همچنین به‌منظور تعیین محل سلول‌های یونوسیت آبشش بچه ماهی هامور معمولی از روش مکان‌یابی ایمنیایی این آنزیم استفاده شد. به‌علاوه پس از انجام مراحل آماده‌سازی برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی نیز از آنتی‌بادی‌های اولیه ($IgG\alpha_5$) و ثانویه (FITC) استفاده شد. سرانجام به‌منظور مشاهده سلول‌های یونوسیت از میکروسکپ نوری فلوئورسنت با فیلترهای ۴۹۰ـ۴۵۰ نانومتر استفاده شد. در مطالعات ایمونوهیستوشیمی، سلول‌های یونوسیت به‌واسطه داشتن مقادیر زیادی از آنزیم Na^+, K^+- ATPase در غشاء قاعده‌ای ـ جانبی خود به‌دلیل شدت انتشار نور بیشتر قابل شناسایی توسط ایمونوهیستوشیمی آنزیم بودند و مکان قرارگیری آنها در ناحیه قاعده و فضای بین تیغه‌ها مشخص گردید. بنابراین در آبشش ماهی هامور معمولی *(E. coioides)* سلول‌های یونوسیت را می‌توان به‌روش ایمنیایی مکان‌یابی کرد. با توجه به یافته‌های این تحقیق که نشان‌دهنده‌ی حضور آنزیم Na^+, K^+- ATPase در غشاء قاعده‌ای ـ جانبی یونوسیت‌ها است، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های یونوسیت در فرآیند تنظیم اسمزی مشارکت فعالانه‌ای دارند.

کلمات کلیدی: *Epinephelus coioides، آبشش، سلول‌های یونوسیت، آنزیم Na^+, K^+- ATPase*

۱. مقدمه

هامورماهیان از خانواده Serranidae، در آب‌های شور دیده می‌شوند. این ماهیان در اکثر کشورهای جنوب شرق آسیا جزء ماهیان مهم پرورشی محسوب می‌شوند و به‌دلیل داشتن گوشت لذیذ و غنی، دارای ارزش اقتصادی بالایی هستند. هامور معمولی ساکن آب شور و نسبت به محیط خود هیپواسمتیک است. در چنین شرایطی، ماهی به‌طور غیر فعال آب از دست می‌دهد و نمک جذب می‌کند. برای جبران این عمل، ماهی آب می‌نوشد و به‌طور فعال یون‌های تک‌ظرفیتی را از خلال آبشش‌ها، و نیز مقداری از یون‌های دو ظرفیتی را از طریق کلیه‌ها دفع می‌کند (Lin et al., 2004). آبشش نقش مهمی در تنظیم اسمزی ماهیان استخوانی ساکن در آب شور دارد و نقش خود را از طریق تغییر در ترشح و باز جذب یون با توجه به شوری و اسمولالیته محیط آبی انجام می‌دهد (Flik et al., 2002). آبشش‌ها در ماهیان در ثابت نگه داشتن ترکیب یونی درون بدن در مواجهه با محیط‌های هیپراسموتیک و هیپواسمتیک نقش بسیار ضروری دارند (Evans et al., 2005). در ماهیان، حفظ اسمولالیته خون و غلظت یون‌ها در سطوحی متفاوت با آنچه در در محیط خارجی وجود دارد، بر پایه انتقال فعال یون‌ها (بخصوص Cl^- و Na^+) و به‌وسیله جذب و یا دفع با توجه شوری محیط استوار است. در این روند، آنزیم‌های زیادی درگیرند (Flik et al., 2002). تحقیقات نشان داده است که آنزیم Na^+, K^+- ATPase نقش محوری در انتقال یونی سلول‌های یونوسیت ایفا می‌کند و پروتئین آلفای تشکیل‌دهنده‌ی ساختار این آنزیم دارای واکنش ایمنیایی است و ثابت شده است که شدت این واکنش با فعالیت آنزیم مرتبط است. (Varsamos et al., 2005; Khodabandeh et al., 2009; Khodabandeh et al., 2004; Nebel et al. 2005). مطالعات ثابت کرده است که اپیتلیوم آبشش اغلب ماهیان دارای سلول‌های یونوسیت یا سلول‌های غنی از میتوکندری است و دارای فعالیت بالایی در تنظیم اسمزی در موجودات آبزی است. با توجه به مطالب ذکر شده و نیز اهمیت فوق‌العاده زیاد ماهی‌هامور چه به لحاظ تغذیه‌ای و چه به لحاظ اقتصادی و نیز عدم انجام مطالعات کافی روی بافت آبشش هامورماهیان و به‌ویژه مکان‌یابی آنزیم Na^+, K^+- ATPase در این بافت مهم و دخیل در تنظیم اسمزی، از روش ایمونوهیستوشیمی برای مکان‌یابی آنزیم و سلول‌های یونوسیت استفاده شده است.

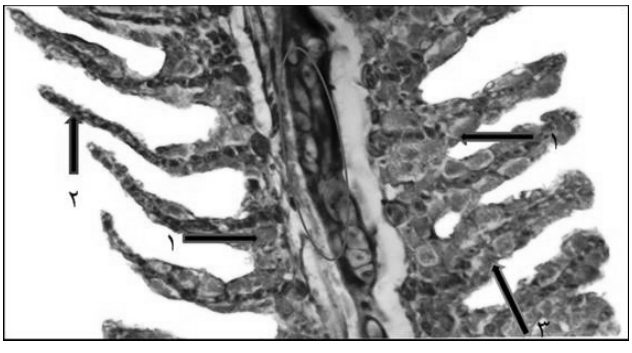
۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌های مربوط به این تحقیق از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) وابسته به پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور تهیه شدند. بدین منظور تعداد ۲۰ عدد بچه ماهی ۳ـ۲ گرمی هامور معمولی تهیه و توسط محلول گل میخک بیهوش شدند. در مرحله بعد، قسمتی از آبشش از کمان آبششی دوم از سمت چپ تهیه و سپس نمونه‌ها به‌منظور فیکس شدن به محلول بوئن انتقال داده شده و به آزمایشگاه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی آبزیان دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل شدند. نمونه‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از بوئن خارج و برای از بین بردن بقایای رنگ زرد فیکساتیو چندین بار در الکل ۷۰٪ شستشو داده شدند. برای انجام کارهای بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی، آبگیری نمونه‌ها با استفاده از سری افزایشی اتانول و در نهایت گزیلول با استفاده از دستگاه پاساژ بافت انجام شد. سپس از قالب‌های تهیه شده برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون با استفاده از میکروتوم نیمه دیجیتال LEICA مدل RM2245 ساخت کشور آلمان تهیه گردید. برای مطالعات بافت‌شناسی لام‌های مربوطه به‌وسیله هماتوکسیلین ـ ائوزین رنگ آمیزی شدند. برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی که در آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس واقع در شهرستان نور انجام شد، برش‌ها پس از تهیه بر روی لام‌هایی با پوشش Poly- L- Lysin قرار داده شدند و مکان‌یابی سلول‌های یونوسیت و آنزیم Na^+, K^+- ATPase بر طبق روش (Khodabandeh et al., 2009; Khodabandeh et al., 2004; Nebel et al., 2005) که در ادامه آمده است، انجام شد. بدین منظور مقاطع تهیه شده را روی لام‌های شیشه‌ای با پوشش poly- L –lysine قرار داده و سپس لام‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰ میلی مول Nacl و ۰/۰۱ میلی مول (Tween ۲۰) حاوی ۱۰ میلی مول بافر فسفات با pH = 7.3 قرار داده شدند. سپس برای پوشاندن گروه‌های آلدئیدی آزاد فیکساتیو، به‌مدت ۵ دقیقه با ۵۰ میلی مول کلرید آمونیوم حاوی PBS با pH= 7.3 تیمار شدند. در مرحله بعد، برش‌ها در PBS شستشو داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در یک محلول بلوک‌کننده شامل 1% bovine serum albomine (BSA) و ژلاتین ۰/۱ درصد حاوی

PBS قرار گرفتند. مکان‌یابی ایمنیایی Na^+, K^+-ATPase با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال $IgG\alpha_5$، که به زیرواحد آلفا متصل می‌شود، توسط میکروسکوپ نوری فلوئورسانس انجام شد. آنتی بادی رقیق شده در PBS به میزان ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر، به لام‌ها اضافه شده و سپس به مدت ۲ ساعت و در دمای اتاق در محیطی مرطوب قرار داده شدند. بعد از این مرحله لام ها در BS شستشو داده شده و به آنها آنتی بادی دوم، فلوئوروکروم فلوئوروسنت (FITC) رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰ در PBS به همراه BSA 0.1% اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در محیطی تاریک نگهداری شدند. یک سری از لام‌ها که به‌عنوان شاهد منفی انتخاب شده و به آنها آنتی بادی اولیه اضافه نشد و آنها در محلول PBS– BSA قرار گرفتند. سرانجام همه لام‌ها در BS شستشو داده شده و با استفاده از چسب مخصوص ایمونوهیستوشیمی مونتاژ شدند. در مرحله آخر از لام‌ها توسط دروبین دیجیتال Olympus متصل به میکروسکوپ فلوئورسنت (Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak 1- Lambda Lamp) با فیلترهای اختصاصی 450 nm -490nm عکسبرداری صورت گرفت.

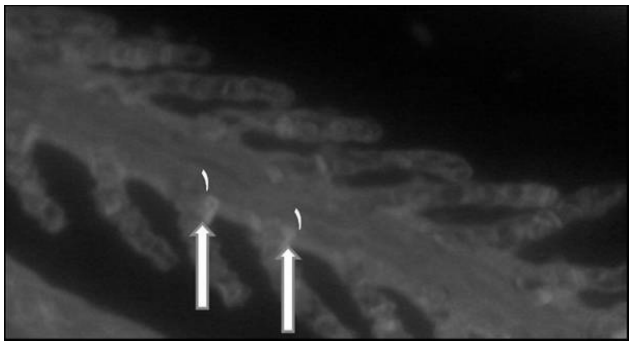
۳. نتایج

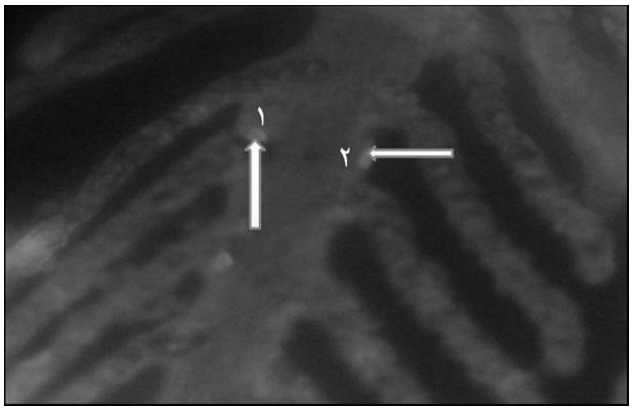
نتایج مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که بر روی هر رشته برانشی در بچه‌ماهی هامور، دو ردیف صفحات نازک و پهن بنام تیغه‌های برانشی به‌صورت عمود قرار گرفته‌اند و آنها در بخش‌های انتهایی رشته فاقد تیغه‌اند (شکل ۱).



شکل ۱ـ برش طولی رشته آبشش (فیلامنت). تیغه‌های آبشش به‌صورت دو ردیفی در دو سمت رشته قابل تشخیص هستند. در قسمت میانی رشته رگ خونی محتوی سلول‌های خونی قابل رویت هستند (شکل بیضی). سلول‌های یونوسیت با رنگ روشن، اندازه درشت و شکل کروی بر روی قاعده و فضای بین تیغه‌ها قابل رویت هستند (۱). همچنین تجمع‌های سلول‌های سنگفرشی (۲) و جامی (۳) بر روی تیغه‌ها قابل رویت هستند (H&Ex400).

در روش ایمونوهیستو شیمی، آنتی بادی اولیه که شامل ($IgG\alpha_5$) است به زیرواحد α آنزیم متصل می‌شود و پس از اضافه کردن آنتی بادی ثانویه در ابتدا به آنتی بادی اولیه متصل شده و سپس، آنزیم Na^+, K^+-ATPase به صورت فلوئورسانس مشخص می‌شود. در سایر لام‌ها، اگرچه هیچ سلولی ایمونوفلئورسانسی از خود بر روی تیغه‌های آبششی نشان نداد، اما تعدادی سلول که بر روی قاعده و فضای بین تیغه ها قرار داشتند دارای ایمونوفلئورسانس بودند. به‌علاوه مشخص گردید که این سلول‌ها به‌صورت گرد تا بیضوی و دارای هسته‌ای درشت در وسط هستند. سلول های یونوسیت اغلب به‌صورت مجتمع و با رنگ‌پذیری متفاوتی نسبت به سایر سلولها مشخص می‌شوند. هسته این سلول‌ها هیچ‌گونه ایمونوفلئورسانسی از خود نشان نداد. مطالعه ایمونوفلئورسانس لام‌ها نشان داد که آنزیم Na^+, K^+-ATPase در سمت قاعده‌ای ـ جانبی سلول‌های یونوسیت آبشش وجود دارد (شکل ۲).





شکل ۲ـ برش طولی رشته‌ها و تیغه‌های آبشش. سلول‌های یونوسیت در فضای بین تیغه‌ای (۲) و قاعده تیغه‌ها (۱) قرار گرفته‌اند. سلول‌های یونوسیت موجود در فضای بین تیغه‌ای اغلب به‌صورت منفرد و آنهایی که روی قاعده تیغه‌ها قرار گرفته‌اند به‌صورت مجتمع دیده می‌شوند. شکل سلول‌های یونوسیت به‌صورت گرد تا بیضوی است.

۴. بحث

حدود ۵٪ از گونه‌های ماهیان استخوانی قادر به مهاجرت از آب شور به شیرین هستند این گونه‌ها دارای دامنه‌ی تحمل وسیعی نسبت به تغییرات شوری محیط هستند. این ویژگی در اجداد ماهیان استخوانی وجود داشته و در طول زمان تکامل یافته است (Evans, 1984). ماهی هامور معمولی که بیشتر در مناطق استوایی و نیمه استوایی زندگی می‌کند نیز دارای این ویژگی است (Heemstra & Randall, 1993). بالغین آنها در مناطق سخت و آبسنگ‌های مرجانی زندگی می‌کنند، در حالی که لاروها و جوانان آنها روی سطح گیاهان آبزی و مصب‌ها زندگی می‌کنند (Caberoy & Quinitio, 2000). مطالعات بافت‌شناسی بر روی آبشش بچه ماهی هامور معمولی حاکی از آن است رشته‌های آبششی توسط تیغه‌های آبششی ظریفی که به‌صورت عمود بر روی آن قرار گرفته‌اند، تشکیل شده است. فضای اشغال شده توسط تیغه‌های آبششی نسبت به رشته‌های آبششی نسبتا زیاد است. بنا براین وسعت بخش تنفسی آبشش در این گونه نسبتا قابل توجه است. مطالعات نشان داده است که در ماهیان پر تحرک مثل آزاد ماهیان نسبت به ماهیان کم تحرک مانند ماهیان کف‌زی، ساختار آبشش وسیع‌تر می‌باشد (Evans et al., 2005). استفاده از آنتی‌بادی ($IgG\alpha_5$) جهت مکان‌یابی آنزیم Na^+, K^+-ATPase و در واقع سلول‌های یونوسیت در حشرات آبزی، سخت پوستان و ماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین کمان، باس دریایی، گوپی، سالمون چام و خامه ماهی از موفق ترین روش‌ها محسوب می‌شود (Lignot et al., 2001; Ziegler 1998). نتایج این مطالعه روی آبشش بچه‌ماهی هامور نشان داد که آنتی بادی ($IgG\alpha_5$) در واکنش با آنزیم Na^+, K^+-ATPase ایمونوفلوئورسانس قابل ملاحظه‌ای تولید می‌کند. بنابراین، این آنتی بادی قادر به شناسایی محل حضور سلول‌های یونوسیت است. سلول‌های ایمونوفلئورسانس در قسمت قاعده و فضای بین تیغه‌های آبشش در ماهی (*E. coioides*) حضور داشتند و سایر سلول‌ها فاقد ایمونوفلئورسانس روی تیغه‌ها بودند. بیشترین تراکم ایمونوفلئورسانس در ناحیه قاعده‌ای ـ جانبی سلول‌ها بیانگر فعال بودن این سلول‌ها در تبادلات یونی است. بر اساس این مشاهدات می‌توان گفت که سلول‌های یونوسیت در بخش قاعده‌ای و فضای بین تیغه‌های آبشش در ماهی (*E. coioides*) یافت می‌شوند. بررسی‌ها بر روی سایر گونه‌های مختلف در آبزیان نشان داد که اگرچه این سلول‌ها معمولا بر روی بافت پوششی تیغه‌ها یافت نمی‌شوند (Evans et al., 2005)، اما سازگاری با شرایط محیطی خاص مثل آب‌های شیرین فقر از نظر یونی در ماهی Armored catfish (*Hypostomus CF. plecostomus*) سبب حضور سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌های آبششی گردیده است (Fernandes & Perna, 2001). ویترز و همکاران با مطالعه بر روی آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند که سلول‌های یونوسیت به‌طور کلی در ناحیه بین تیغه‌های آبششی قرار می‌گیرند (Witters et al., 1998). همچنین در یک کار تحقیقی مشخص شده است که در Paddlefish (*Polydon spathula*)، سلول‌های یونوسیت در ناحیه قاعده‌ای تیغه‌های آبششی و همچنین بین تیغه‌ها قرار می‌گیرند (Krayushkina et al., 2000). نتایج تحقیقات شیکانو و همکاران در سال ۱۹۹۸ با مطالعه بر روی ماهی گوپی نشان داد که طی دوره‌ی سازگاری این ماهی با آب دریا و آب شیرین هم تعداد و هم اندازه سلول‌های یونوسیت و میزان حضور آنزیم Na^+, K^+-ATPase برای تنظیم یونی بسیار ضروری است (Shikano & Fujio., 1998). همچنین در اسبله ماهیان سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌های آبششی حضور نداشته و حضور سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌های آبششی ماهیان سازگار شده با آب شیرین برای کمک به جبران نیازهای فیزیولوژیکی بدن است (Laurent & Perry, 1991). نتایج این تحقیق نشان داد که سلول‌های یونوسیت آبشش (*E. coioides*) به‌صورت گرد تا بیضوی بوده و آنزیم Na^+, K^+-ATPase در غشای قاعده‌ای ـ جانبی این سلولها قرار گرفته است. بنابراین، همان طور که بیان شد در آبشش ماهی هامور معمولی (*E. coioides*) در مقایسه با کارهای انجام شده توسط سایر محققین بر روی سایر گونه‌ها، سلول‌های یونوسیت را می‌توان به روش ایمنیایی مکان‌یابی کرد. با توجه به یافته‌های این تحقیق به این نتیجه می‌توان رسید که سلول‌های یونوسیت در فرآیند تنظیم اسمزی به‌طور قابل ملاحظه‌ای به‌صورت فعالانه دخالت دارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی گروه بیولوژی دریای دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر است که با همکاری صمیمانه آقای جمشید امیری مقدم انجام شده و لذا از زحمات بی‌دریغ ایشان تشکر می‌شود. همچنین از زحمات آقای حسینی مسوول محترم آزمایشگاه بیولوژی دریای دانشکده علوم

دریایی دانشگاه تربیت مدرس تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

Caberoy, N. B. and Quinitio, G.F. 2000. Changes in Na^+, K^+- ATPase activity and gill chloride cell morphology the grouper *Epinephleuscoioides*larvae and juveniles in response to salinity and temperature. Fish Physiology and Biochemistry. 23: 83- 94.

Evans, DH. 1984. The roles of gill permeability and transport mechanisms in euryhalinity. In: Hoar WS, Randall DJ (eds). Fish physiology. Academic Press. New York. 239-283.

Evans, DH.; Piermarini, PM. and Choe, KP. 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nittogenous Waste . Physiol Rev. 85: 97-177

Fernandezs, MN. and Perna-Martines, SA. 2001. Epithelial gill cells in the Armord catfish, *Hypostomus CF. plecostomus* (Loricariidae). Rev rasil boil. 61(1):69-78

Flik, G.; Varsamos, S.; Guerreiro, PMG. and Fenwich X. 2002. Drinking in (very young) fish. Bios Sci Publishers Ltd. Oxford.54: 31- 47.

Heemstra, P.C. and Randall, J.E. 1993. Groupers of the world (family Serranidae, subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rock cod, hind, coral grouper known to date. FAO Fisheries Synopsis. 125(16). 382 pp.

Khodabandeh, S.; Khoshnood, Z. and Mosafer, S. 2009. Immunolocalization of Na^+, K^+- ATPase-rich cells in the gill and urinary system of Persian sturgeon, *Acipenserpersicus*, fry. Aquaculture Research. 40: 329- 336.

Khodabandeh, S.; Kutnik, M.; Aujoulat, F.; Charmantier, G.; Charmantier- Daures, M. 2004. Ontogeny of the antennal gland in the crayfish *Astacusleptodactylus* (Crustacea, Decapoda): Immunolocalization of Na^+, K^+- ATPase. Cell Tissue Res. 319:167- 174.

Krayushkina, LS.; Semenova, OG.; Panov, AA.; Gerasimov, AA. and Ogorzalek, A. 2000. Reaction of the osmoregulatory system of the paddlefish *Polydon spathula* Walb. To marine environment. Zoologica Poloniae. 45(1-4):95-120

Laurent. P. and Perrt. SF. 1991. Environmeny effects on fish gill morphology. Physiol Zool. 64: 4-25.

Lin, C.H.; Tsai, R.S. and Lee, T.H. 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. Part A. 138: 287– 295.

Lignot, JH.; Chamantier-Daures, M. and Chamantier, G. 2001. Immunolocalization of Na^+, K^+- ATPase in the organs of the branchial cavity of the Europian lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, decapoda). Cell Tissue Res. 296: 417-426

Nebel, C.; Negre-Sadargues, G.; Blasco, C. and Charmantier, G. 2005. Morphological ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrachuslabrax*. Anatomy of Embryology. 209: 193- 206.

Shikano, T. and Fujio, Y. 1998. Relationship of salinity tolerance to immunolocalization in gill epitheliumduring sea water and fresh water adaption of the Guppy, *Poecilia reticulatae*. Zoologica Science. 15: 35-41.

Varsamos, S.; Wendelaar Bonga, SE.; Flik, G.; Quere, R. and Commes, T. 2005. Cloning of apiromelanocortin cDNA from the pituity gland of the sea bass *Dicentrachus labrax* and assessment of mRNA expression in different tissues by means of real-time PCR. J Endocrinol. 176: 405-414.

Witters, H.; Berckmans, P.; Vangenechten, C. 1998. Immunolocziation of ionocyte cells in gill epithelium

Na^+, K^+- ATPase in the calcium transporting sterna epithelium of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* L (Crustacean). J Histochem Cytochem. 45: 437-446.

of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*, Cell and Tissue Rea. 283(3): 461-468.

Ziegler, A. 1998. Immunocytochemical localization of