

## مطالعه‌ی هیستوشیمیایی و هیستومورفومتری سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس در نواحی مختلف اپیدرم پوست ماهی کفشک راست گرد

نعیم عرفانی‌مجد<sup>۱\*</sup>، سارا ارتفاعات<sup>۲</sup>، احمد سواری<sup>۳</sup> و نگین سلامات<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۱

### چکیده

این تحقیق روی تعداد ۵ قطعه از ۱۵ قطعه ماهی کفشک راست گرد بالغ، سالم، ماده و با میانگین وزنی  $170/41 \pm 790/4$  گرم در فصل تولید مثلی (شهریور) انجام گردید. ماهی‌ها با استفاده از تور گوش‌گیر از منطقه‌ی خور موسی صید گردید. پس از بررسی‌های ماکروسکوپی جهت مطالعات میکروسکوپی، از نواحی پشتی، پشتی جانبی (روی خط جانبی)، شکمی، سری و دمی پوست حداقل ۵ قطعه از ماهیان به ظاهر سالم، نمونه‌هایی به ضخامت حداکثر  $0/5$  سانتی‌متر برداشت گردید و در محلول ثیوتی بوئن قرار داده شدند. سپس به روش استاندارد و معمول تهیه‌ی مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت ۶-۵ میکرومتر تهیه شدند و مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اؤزین و آلسین بلو با  $pH=2.5$  و PAS قرار گرفتند. با انجام رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی آلسین بلو با  $pH=2.5$  سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس اسیدی به رنگ آبی و در رنگ‌آمیزی PAS سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس خنثی به رنگ ارغوانی مشخص شدند. بنابراین اپیدرم پوست این ماهی دارای دو نوع سلول ترشح‌کننده‌ی موکوسی اسیدی و خنثی می‌باشد. پراکنده‌گی و تعداد سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوسی اسیدی در نواحی مختلف اپیدرم پوست این ماهی دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0/05$ )؛ به طوری که این اختلاف در ناحیه‌ی شکمی با ناحیه‌ی پشتی و سری معنی‌دار بوده ولی تعداد سلول‌های موکوسی خنثی در نواحی مختلف اپیدرم پوست این ماهی، اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند ( $P > 0/05$ ).

**کلمات کلیدی:** هیستوشیمی، میکرومتری، سلول‌های ترشح‌کننده موکوس، اپیدرم، ماهی کفشک راست گرد

### مقدمه

ترشح موکوس یکی از مشخصات اپیدرم همه ماهیان استخوانی و تعداد زیادی از دیگر مهره‌داران آبی است (Pickering 1973). ترشح موکوس به طور پیوسته بوده و از ایجاد کلنی توسط انگل‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها جلوگیری می‌کند (Bols et al. 2001). این خاصیت برای اولین بار در قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شده است. ماهیان برای مقابله با پاتوژن‌هایی که آن‌ها را مورد تهاجم قرار می‌دهند، به مکانسیم‌های ایمنی ذاتی خود وابسته هستند و ترشحات موکوسی اپیدرم به عنوان یک کلید ترکیبی برای این مصونیت ذاتی است (Subramanian

et al. 2008). گزارش‌های زیادی که در مورد پوست ماهیان استخوانی وجود دارد، همگی اثر تغییرات فصلی و جنس بر ساختار اپیدرم پوست ماهیان را بیان می‌کنند. Fletcher و همکاران در سال ۱۹۷۶ گلیکوپروتئین‌های موکوس ماهی را در سه محیط دریایی، آب شیرین و مصب مورد مطالعه قرار داده و به ارتباط میان شوری زیستگاه و نوع گلیکوپروتئین‌های اپیدرمی اشاره کرده‌اند. چنین ملاحظاتی نشان می‌دهند که ویژگی‌های موکوس بیانگر زندگی و نوع زیستگاه است. انجام این تحقیق برای پی بردن به وجود انواع سلول‌های ترشح‌کننده‌ی

(نویسنده مسئول)

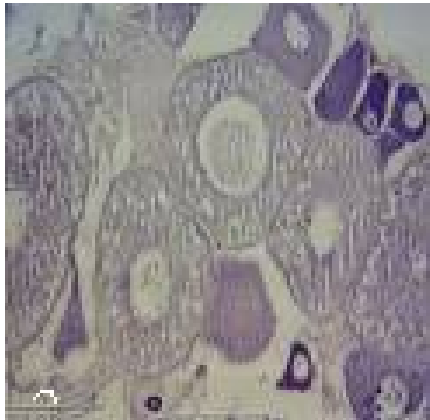
E-mail: naeemalbo@yahoo.com

<sup>۱\*</sup> استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

<sup>۲</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بافت‌شناسی آبزیان، دانشکده‌ی علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

<sup>۳</sup> استاد گروه بیولوژی زیست دریا، دانشکده‌ی علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

<sup>۴</sup> استادیار گروه بیولوژی زیست دریا، دانشکده‌ی علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر



تصویر ۲: نمای میکروسکوپی گناده جنس ماده  
(H&E, X20)

برای مطالعات هیستومتری و تعیین میزان پراکنش سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس، حداقل پنج برش بافتی از هر نمونه و در هر برش حداقل پنج میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰ برابر و در ۱۰۰ میکرومتر از طول اپیدرم هر ناحیه مورد شمارش و اندازه‌گیری قرار گرفت. بررسی‌های هیستومتری با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به لنز دیجیتال Dino Lite و نرم‌افزار Dino capture 1 انجام گرفت.

نتایج هیستومتری به دست آمده به وسیله‌ی نسخه‌ی شماره‌ی ۱۱/۵ نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و از آزمون تحلیل واریانس جهت مقایسه‌ی یکسان یا غیر یکسان بودن متغیرهای مورد مطالعه و از آزمون توکی جهت مقایسه‌ی دو به دو و تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف بین آن‌ها استفاده گردید.

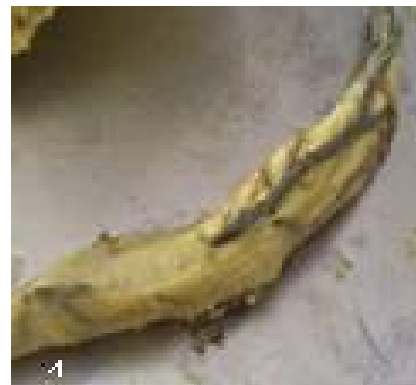
### نتایج

در بررسی‌های میکروسکوپی، سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس اپیدرم که با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شده بودند، رنگی به خود نگرفته و به شکل حفره‌های روشن در بین سلول‌های پوششی اپیدرم پوست مشاهده شدند (تصویر ۳).

موکوس و پراکنندگی آن‌ها در نواحی مختلف اپیدرم پوست ماهی کفشک راست گرد می‌باشد.

### مواد و روش کار

در این تحقیق در فصل تولید و مثل (شهریور ماه) تعداد ۱۵ قطعه ماهی کفشک راست گرد<sup>۱</sup> بالغ و سالم با استفاده از تور گوش‌گیر از خور موسی صید شدند. سپس از این تعداد ۵ قطعه ماهی بالغ، سالم و هم جنس (ماده) انتخاب گردیدند. وزن این ماهیان در فصل تولید و مثلی به طور میانگین ۷۹۰±۱۷۰/۴۱ گرم و میانگین طولی آن‌ها (از ابتدای سر تا انتهای دم) ۳۹/۱۶±۵/۷۲ سانتی‌متر بود. برای تشخیص ماهیان ماده، بافت گناده جداسازی شده و در محلول ثبوتی بوئن قرار داده شد و از طریق مطالعه ماکروسکوپی (تصویر ۱) و میکروسکوپی (تصویر ۲) جنسیت ماهیان مشخص گردید. برای مطالعه‌ی سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس اپیدرم پوست این ماهی از نواحی مختلف آن (شکمی، سری، دمی، پشتی و پشتی جانبی (روی خط جانبی)، نمونه‌هایی به ضخامت حداقل ۰/۵ سانتی‌متر در یکی از ابعاد، تهیه و برای ثبوت به محلول بوئن منتقل شدند. جهت تشخیص سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اپیدرم از رنگ‌آمیزی‌های H&E، PAS و آلسین بلو (AB) با pH=2.5 استفاده گردید (Bancroft and Gamble 2002).



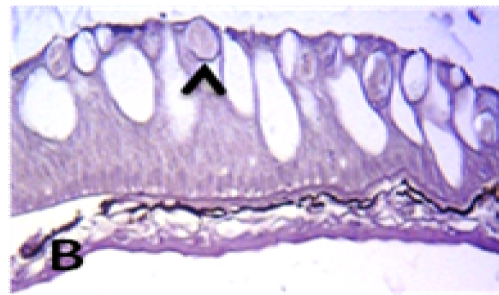
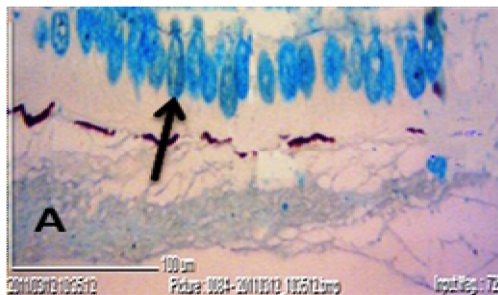
تصویر ۱: نمای ماکروسکوپی گناده جنس ماده.

سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اسیدی استفاده شده بود، فقط سلول‌های حاوی موسین اسیدی (موسین‌های سولفات‌ه و N-استیل‌سیالوموسین‌ها) به رنگ آبی و از سلول‌های حاوی موسین خنثی که رنگی به خود نگرفته بودند، کاملاً متمایز شدند (تصویر ۴A) و در رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS)، موسین این سلول‌ها به رنگ قرمز ارغوانی رنگ‌آمیزی شد (تصویر ۴B). هم‌چنان‌که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، تعداد سلول‌های ترشح‌کننده موکوس خنثی و اسیدی در نواحی مختلف اپی‌درم متفاوت می‌باشد (تصویر ۵).



تصویر ۳: سلول‌های ترشح‌کننده موکوس (پیکان) در بافت پوششی اپیدرم پوست ماهی کفشک راست گرد به شکل حفراتی روشن مشخص هستند (H&E, X40).

در رنگ‌آمیزی آلسین بلو با pH=۲/۵ که برای تشخیص



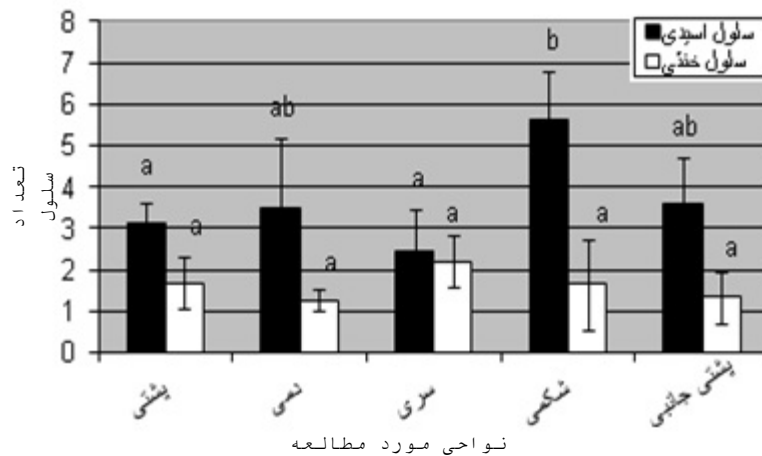
تصویر ۴: A- سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اسیدی به رنگ آبی (پیکان) در رنگ‌آمیزی آلسین بلو و B- سلول‌های ترشح‌کننده موکوس خنثی (نوک پیکان) به رنگ قرمز ارغوانی در رنگ‌آمیزی PAS در اپیدرم پوست ماهی کفشک راست گرد قابل مشاهده هستند (X10).

( $P < 0/05$ )؛ ولی نواحی مختلف اپیدرم پوست ماهی کفشک راست گرد از لحاظ پراکندگی سلول‌های ترشح‌کننده موکوس خنثی با هم اختلاف معنی‌داری ندارند ( $P > 0/05$ ). به طور کلی از نظر فراوانی، در تمامی نواحی پوست تعداد سلول‌های موکوسی اسیدی بیشتر از سلول‌های موکوسی خنثی هستند (نمودار ۱).

نتایج آزمون تحلیل واریانس، نشان داد که نواحی مختلف پوست ماهی کفشک راست گرد از لحاظ پراکندگی سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اسیدی با هم تفاوت دارند. این اختلاف در تعداد سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اسیدی اپیدرم پوست ناحیه شکمی با نواحی پشتی، پشتی جانبی، دم‌ی و سری و همچنین ناحیه پشتی جانبی با نواحی پشتی و سری معنی‌دار می‌باشد.

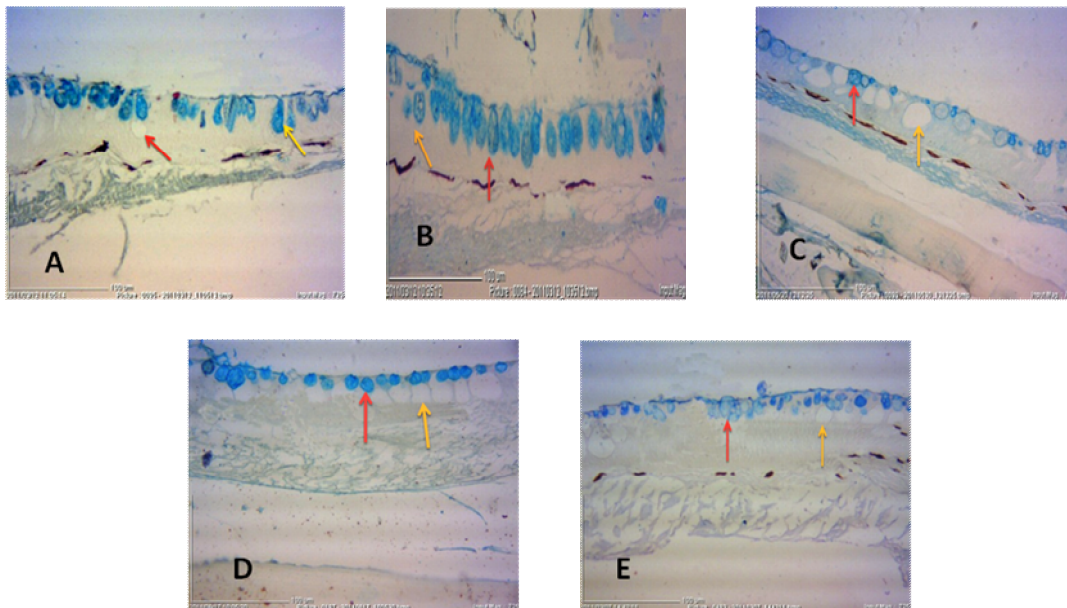
جدول ۱: میانگین و انحراف از معیار تعداد سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اسیدی و خنثی در نواحی مختلف ۱۰۰ میکرومتر از طول اپیدرم پوست ماهی کفشک راست گرد به ترتیب فراوانی

سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اسیدی		سلول‌های ترشح‌کننده موکوس خنثی	
تعداد سلول	نواحی مورد مطالعه	تعداد سلول	نواحی مورد مطالعه
۲/۲ ± ۰/۶۳	سری	۵/۶۴ ± ۱/۱۳	ناحیه شکمی
۱/۶۸ ± ۰/۶۱	پشتی	۳/۶ ± ۱/۰۹	ناحیه پشتی جانبی
۱/۶۴ ± ۱/۱۱	شکمی	۳/۴۹ ± ۱/۶۷	ناحیه دم‌ی
۱/۳۳ ± ۰/۶۲	پشتی جانبی	۳/۱۳ ± ۰/۵	ناحیه پشتی
۱/۲۷ ± ۰/۲۸	دم‌ی	۲/۴۴ ± ۱	ناحیه سری



نمودار ۱: مقایسه‌ی میانگین تعداد سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس در ۱۰۰ میکرومتر از طول اپیدرم نواحی مختلف پوست ماهی کفشک راست گرد در فصل تولید و مثلی

حروف متفاوت *a*، *b* و *ab* در بالای ستون‌های تیره بیانگر اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) و حروف مشابه در هر یک از دو ستون تیره و روشن بیانگر اختلاف غیرمعنی‌دار ( $P > 0.05$ ) می‌باشند.



تصویر ۵: دو نوع سلول ترشح‌کننده‌ی موکوس اسیدی (پیکان قرمز) و خشی (پیکان زرد) در نواحی مورد مطالعه در فصل تولید و مثل را نشان می‌دهد پشته *A*، دمی *B*، سری *C*، شکمی *D*، پشتی جنبی *E* (Alcian Blue PH 2.5, X10).

### بحث

مرحله‌ی تکاملی) و فاکتورهای خارجی (تنش‌زا و عفونت‌ها) قرار می‌گیرند (Al-Banaw et al. 2009). سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس مسئول اصلی تولید و ترشح موکوس لزجی است که اطراف بدن ماهی را می‌پوشاند و از آن‌جا که قسمت عمده‌ی ترشحات از نوع

پوست ماهیان به طور مداوم در معرض آب دریا می‌باشد و موکوس در حفاظت از موجود و هم‌چنین به عنوان فاکتور مهمی در مقاومت به بیماری عمل می‌کند. سلول‌های موکوسی و ترکیب موکوسی که این سلول‌ها تولید می‌کنند، تحت تأثیر فاکتورهای داخلی (جنس،

به زمان غیر تولید و مثل دارد، تعداد، پراکندگی و موسین ترشحی سلول‌های ترشح کننده‌ی موكوس، تغییر یافته است و بیشترین پراکندگی و تعداد در قسمت شکمی قرار دارد تا در هنگام حرکت و جا به جایی که از روی ناحیه‌ی شکمی بر روی بستر می‌باشد، از خراشیدگی در امان باشد؛ همانند وضعیتی که در ماهیان حفار دیده شده است که برای حفاظت خود به لایه‌های موكوسی خود وابسته هستند (Zaccone et al. 2002).

محل زندگی کفشک ماهیان، مناطق مصبی می‌باشد؛ این مناطق دارای شرایط استرس‌زای شدید بوده و احتمالاً نمونه‌های مورد مطالعه در پاسخ به این استرس‌های شدید که می‌تواند ورود انواع آلودگی‌ها، دما، میزان اکسیژن محلول و غیره باشند، پراکندگی سلول‌های ترشح کننده‌ی اسیدی‌شان افزایش یافته است؛ به طوری که در تحقیق Fletcher و همکارانش در سال ۱۹۷۶ نیز به این نتیجه رسیدند که ماهی په لیس تمام گلیکوپروتئین‌های اسیدی است ولی در کفشک مصبی مخلوطی از گلیکوپروتئین اسیدی و خشتی می‌باشد.

مشخص شده است که تغییرات سلولی اپیدرم در ماهی کفشک به سیکل تولید و مثل وابسته است (Elliott 2000). Pottinger و Pickring در سال ۱۹۸۴ با مطالعه اپیدرم پوست ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای دریافت که فراوانی سلول‌های ترشح کننده‌ی موكوس در زمان تخم‌ریزی در جنس ماده افزایش می‌یابد؛ در حالی که در همین زمان تعداد این سلول‌ها در جنس نر کاهش زیادی نشان داده است. بنابراین احتمال دارد تعداد سلول‌ها فقط به یک‌سری فاکتورهای تولید و مثلی از جمله هورمون‌های تولید و مثل بستگی داشته باشد، که اپیدرم ماهیان استخوانی را تحت تأثیر قرار داده است.

موکوپلی ساکارید و گلیکوپروتئین است، این سلول‌ها در رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS) و آلسین بلو با pH 2.5 واکنش مثبت نشان دادند. رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS) که برای رنگ‌آمیزی موسین‌های حاوی ترکیبات هگزوز شامل موسین‌های خشتی و نیز موادی نظیر کربوهیدرات‌ها و گلیکوژن مورد استفاده قرار می‌گیرد، گروه‌های آلدئیدی حاصل از اکسید شدن گروه‌های آلفا امینو الکل و یا ۱ و ۲ گلیکول با معرف شیف واکنش داده و ترکیبی را به وجود می‌آورند که در زیر میکروسکوپ نوری سیتوپلاسم این ترکیبات را به رنگ قرمز ارغوانی رنگ‌آمیزی می‌کند و آلسین بلو با pH 2.5 موسین‌های اسیدی سولفات و غیرسولفات را به رنگ آبی رنگ‌آمیزی می‌کند. حضور سلول‌های ترشح کننده‌ی موكوس در اپیدرم پوست اکثر ماهیان استخوانی، عالی گزارش شده است (Elliott 2000)؛ اما با وجود این، در اپیدرم پوست ماهیان دهان گرد، نظیر لامپری و نیز برخی ماهیان دیگر از قبیل پولیودن و گل خورک<sup>۱</sup> (پریوفتالموس) مشاهده نشده است (Park 2002).

مطالعات هیستوشیمی تحقیق حاضر نشان داد که سلول‌های ترشح کننده‌ی موكوس در این نوع ماهی دو نوع‌اند که به ترتیب فراوانی شامل سلول‌های با موسین اسیدی و خشتی می‌باشند. این یافته‌ها مطابق با یافته‌های Fletcher و همکارانش در سال ۱۹۷۶ در مطالعه‌ای برای تعیین گلیکوپروتئین‌های سلول‌های جامی شکل قزل‌آلای رنگین‌کمان و دو گونه کفشک است و همچنین مطابق با یافته‌های Al-Banaw و همکارانش در سال ۲۰۰۹، در مورد پوست گربه‌ماهی می‌باشد.

به نظر می‌رسد تغییرات در پراکندگی و موسین ترشحی سلول‌های ترشح کننده‌ی موكوس تحت تأثیر، میزان فعالیت‌های ماهی کفشک راست گرد در طی فصل نمونه‌برداری باشد؛ به طوری که در فصل تولید و مثل با توجه به رفتار شناسی این ماهی که حرکت بیشتری نسبت

## منابع

- Al-Banaw, A.; Kenngott, R.; Al-Hassan, J.M.; Mehana, N. and Sinowatz, F. (2009). Histochemical analysis of glycoconjugates in the skin of a catfish (*Arius Tenuispinis*, Day). *Anatomia, Histologia, Embryologia Journal*, 39: 42-50.
- Bancroft, J.D. and Gamble M. (2002). *Theory and Practice of Histological and Histochemical Techniques*. 3<sup>th</sup> edition, Butter Worths, pp: 127, 175.
- Bols, N.C.; Brubacher, J.L.; Ganassin, R.C. and Lee, L.E.J. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9): 853-873.
- Elliott, D.G. (2000). Integumentary system. In: Ostrander, G. K. (Ed). *The Laboratory Fish*. Academic Press, New York, pp: 95-109.
- Fletcher, G.L. (1976). Circannual cycles of blood plasma freezing point and Na<sup>+</sup> and Cl concentrations in Newfoundland winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): correlation with water temperature and photoperiod. *Canadian Journal of Zoology*, 55: 789-759.
- Park, J.Y. (2002). Structur of the skin of an air-breathing mudskiper, *Periophthalmus magnuspinnatus*. *Journal of Fish Biology*, 60: 1543-1550.
- Pickering, A.D. (1973). The distribution of mucouls cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* and the char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal Fish Biology*, 6: 111-118.
- Pottinger, T.G. and Pickering, A.L. (1984). The Effects of 11-Ketotestosterone and Testosterone on the Skin Structure of Brown Trout, *Salmo trutta L.* *Journal General and Comparative Endocrinology*, 59: 335-342.
- Subramanian, S.; Subramanian, S.; Ross, N.W. and Mac Kinnon, S.L. (2008). Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 150: 85-92.
- Zaccone, G.; Kapoor, B.G.; Fasulo, S. and Ainis, L. (2001). Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes. *Advances in Marine Biology*, 40: 253-276.

## Histochemical and histomorphometrical studies of mucous secreting cells in different regions of epidermis in *Euryglossa orientalis* fish

Erfani majd, N.<sup>1</sup>; Ertefaat, S.<sup>2</sup>; Savary, A.<sup>3</sup> and Salamat, N.<sup>4</sup>

Received: 12.06.2012

Accepted: 1.05.2013

### Abstract

This study was done on the skin of 5 of 15 normal and mature female soleid fish with average weight of  $790.4 \pm 170.41$  gr in reproductive season (September) from khor Musa area. The fish were caught with gill net from mouse creek. In order to conduct a microscopical study, 0.5 cm thick samples were taken from different parts of the skin, including dorsal, lateral (on lateral line), ventral, head and tail. The samples were fixed in Bouin's solution and 5-6  $\mu$ m thick sections were made using routine paraffin embedding method and were stained by H&E, Alcian blue (AB) pH 2.5 and PAS. The histochemical results showed that there are 2 types of mucous secreting cells (acidic and neutral) in epidermis of Soleid fish. The acidic mucous secreting cells were stained blue in AB staining and neutral mucous secreting cells were stained purple in PAS staining and they were recognized from other cells easily. Histometrical results showed that the number and distribution of acidic mucous cells varied in different regions of skin, so that these cells were more in ventral region than dorsal and head ( $P < 0.05$ ) but there were no significant differences between the number of neutral cells in different regions of skin ( $P > 0.05$ ).

**Key words:** Histochemical, Micrometry, Mucous secreting cells, Epidermis, *Euryglossa orientalis*

---

1- Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

2- MSc. Graduated of Fish Histology from Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr Marine Sciences and Technology University, Khorramshahr, Iran

3- Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr Marine Sciences and Technology University, Khorramshahr, Iran

4- Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr Marine Sciences and Technology University, Khorramshahr, Iran

**Corresponding Author:** Erfani majd, N., E-mail: naeemalbo@yahoo.com