هیستوشیمی و پراکنش سلول‌های جامی‌شکل ترشح‌کننده‌ی موکوس در نواحی مختلف اپیدرم پوست بدن ماهی کپور نقره‌ای بالغ نر و ماده

نعیم عرفانی‌مجد[۱*]، مهرزاد مصباح[۲] و کاوه اسفندیاری[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۳

چکیده

یکی از سلول‌های اپیدرم پوست بدن ماهی که وظیفه‌ی اصلی آن ترشح موکوس پوست بدن ماهی می‌باشد، سلول‌های جامی‌شکل می‌باشند. به منظور مطالعه‌ی بافت‌شناسی و تعیین پراکنش این سلول‌ها، تعداد ۱۰ ماهی کپور نقره‌ای بالغ نر (۵ عدد) و ماده (۵ عدد) مورد مطالعه قرار گرفت و از پوست نواحی مختلف بدن شامل نواحی سر، پشت، شکم و دم، نمونه‌هایی حداکثر به ضخامت ۵ میلی‌متر تهیه گردید و پس از طی روش‌های استاندارد تهیه‌ی مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر تهیه و با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)، پریودیک اسید شیف (PAS)، آلسین بلو با اسیدیته ۲/۵ (AB, pH=2.5)، آلسین بلو با اسیدیته ۱(AB, pH=1) و آلسین بلو با اسیدیته ۲/۵- پریودیک اسید شیف (AB, pH=2.5-PAS) رنگ‌آمیزی شدند. تعداد این سلول‌ها در ۱۰۰ میکرومتر از طول و در کل ضخامت اپی‌درم پوست هر ناحیه مورد شمارش قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که سلول‌های بیضی شکل تا چند وجهی و کوچکی به نام سلول‌های موکوسی جامی شکل در اپیدرم نواحی مختلف پوست ماهی کپور نقره‌ای وجود دارند. این سلول‌ها در رنگ‌آمیزی PAS واکنش مثبت داشتند و به رنگ ارغوانی رنگ‌آمیزی شدند که بیانگر ماهیت شیمیایی خنثی موکوس ترشحی این سلول‌ها می‌باشد. پراکندگی این سلول‌ها در نواحی مختلف پوست این ماهی متفاوت است و بر اساس پراکندگی آن‌ها پوست نواحی مختلف در دو جنس نر و ماده به نواحی سر، پشتی، شکمی و دم تقسیم گردید. این نتایج بیانگر این واقعییت است که بیش‌ترین تعداد سلول‌های جامی‌شکل در جنس نر در ناحیه‌ی سر و در جنس ماده در ناحیه‌ی پشتی قرار دارند و تعداد این سلول‌ها در ناحیه‌ی دمی پوست ماهیان نر و ماده تقریباً یکسان است.

کلمات کلیدی: هیستومتری، هیستوشیمی، سلول‌های جامی‌شکل، پوست، ماهی کپور نقره‌ای

مقدمه

ترشحات اپیدرم ماهیان منشأ متفاوتی دارند که حاوی نسبت‌های متفاوت موکوس و پروتئین هستند. موکوس از خراشیدگی پوست ماهیان حفار یا ماهیانی که می‌توانند بر خشکی حرکت کنند حفاظت می‌کند (ستاری ۱۳۸۲) و در بعضی از ماهیان دارای خواص کاهنده‌ی اصطکاک است که به ماهی کمک می‌کند تا با سرعت بیش‌تر و صرف انرژی کم‌تر به حرکت خود ادامه دهد (Mittal 1997). هم‌چنین ماده‌ی موکوسی اطراف پوست به عنوان اولین سد دفاعی بدن ماهی در مقابل محیط خارجی، نقش مهمی در سلامت و بهداشت ماهیان ایفا می‌کند (McKim and Lien 2001). این ترشحات لزج پیرامون پوست ماهی حاوی موادی مانند کرینوتوکسین‌ها، کالمودولین‌ها، فرمون‌ها و انواعی از مواد ضد عوامل بیماری‌زا مانند ایمونوگلوبولین‌ها، اجزای کمپلمان، لیزوزیم، آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی پروتئین، لکتین‌ها و سایر پپتیدها و پروتئین‌های ضدمیکروبی است

[۱*] استاد گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز (نویسنده‌ی مسئول) E-mail: naeemalbo@yahoo.com

[۲] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانشجوی کارشناسی‌ارشد بافت‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

Alexander and Ingram 1992, Fast et al. 2002,) Kosuga et al. 2002). سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس، غدد برون‌ریز تک‌سلولی هستند که پوشش لزج سطح بدن ماهیان را به وجود می‌آورند (Whitear 1986). در برخی از ماهیان این سلول‌ها چند نوع گلیکوپروتئین تولید می‌کنند و ترکیب شیمیایی موکوس تولید شده در اثر دگردیسی نوزادی یا به دلیل رویارویی ماهی با مواد سمی و هم‌چنین عواملی نظیر تغییرات محیطی نظیر شوری، تغییر درجه‌ی حرارت و pH آب تغییر می‌کند (Elliott 2000, McKim and Lien 2001). شکل، اندازه و فراوانی این سلول‌ها در گونه‌های مختلف ماهیان و در نواحی مختلف پوست یک ماهی متفاوت است (Mittal 1997). سلول‌های موکوسی جامی‌شکل و سلول‌های موکوسی هشدار دهنده مسئول ترشح موکوس در اپیدرم ماهیان می‌باشند. سلول‌های موکوسی جامی‌شکل از سلول‌های پوششی استوانه‌ای مستقر روی غشای پایه تمایز حاصل می‌کنند (Roberts 2001) و سیتوپلاسم آن‌ها نسبت به رنگ‌آمیزی PAS و آلکالین آبی واکنش مثبت نشان می‌دهد (Takashi and Hibiya 1994). سلول‌های جامی‌شکل توسط محققین مختلف به نام‌های متفاوتی از قبیل سلول‌های موکوسی خنثی، سلول‌های اصلی ترشح‌کننده‌ی موکوس، سلول Becherzelln، سلول Keleinsten sheleimzellen، سلول Calciformes و Cellules muqueuses of mucipares نام‌گذاری شده‌اند (Elliott 2000, Mittal 1997). معمولاً هنگامی که ترشحات موکوسی کامل و آماده‌ی آزادسازی می‌شوند، هسته و اندامک‌های سلولی به طرف قاعده‌ی سلول فشرده می‌شوند، غشای این سلول‌ها پس از رسیدن به سطح اپیدرم، از نقطه‌ی رأسی پاره و محتویات سلول به سطح پوست بدن ماهی آزاد می‌شود. از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی، هسته‌ی سلول‌های جامی شکل بر خلاف سلول‌های پوششی فاقد چین‌خوردگی می‌باشند و این سلول‌ها واجد شبکه‌ی آندوپلاسمی خشن فراوان و دستگاه گلژی واضح هستند (Iger et al. 1994c). تعداد این سلول‌ها ممکن است در بین جنس‌های نر و ماده یک گونه ماهی متفاوت باشد. تغییرات اوضاع محیطی مانند تغییرات ناگهانی دما، مواجه شدن با اشعه‌ی ماوراء بنفش، آب‌های اسیدی و آلاینده‌ها نیز می‌توانند بر تعداد سلول‌های جامی شکل اپیدرم تأثیر بگذارند (Iger et al. 1994b, Kaweewat and Hofer 1997). عوامل استرس‌زا مانند دست‌کاری یک ماهی می‌تواند باعث افزایش تعداد سلول‌های جامی‌شکل اپیدرم پوست بدن ماهی شود. مواجهه حاد با یک ماده‌ی محرک ممکن است باعث ترشح سلول‌های جامی شکل به صورت هولوکرین و در نتیجه کاهش تعداد آن‌ها شود، در حالی که مواجهه مزمن با یک ماده‌ی محرک ممکن است باعث افزایش فراوانی این سلول‌ها شود و با سرعت بیش‌تری از سلول‌های پوششی لایه‌های پایین‌تر اپیدرم تمایز حاصل کنند و با تولید موکوس بیش‌تر، موجب افزایش مکانیسم دفاعی شوند و در برخی از گونه‌ها مانند آزادماهیان، بخش اعظم ترشحات موکوسی اپیدرم از سلول‌های جامی شکل منشأ می‌گیرند (Whitear 1986). سلول‌های جامی شکل دارای توانایی بیگانه‌خواری نیز هستند و در هنگام التیام زخم به دفع بقایای سلولی از پوست کمک می‌کنند (Iger etal. 1994b).

شواهدی مبنی بر حضور ایمونوگلوبولین در سلول‌های جامی‌شکل وجود دارد که باعث شده تا برخی محققین این فرضیه را مطرح کنند که ممکن است این سلول‌ها از طریق دخالت در تولید یا عمل آوری پادتن در ایمنی موضعی پوست نقش داشته باشند (Nakamura et al. 2002). دسته‌ی دیگر سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس پوست بدن ماهیان سلول‌های موکوسی هشدار دهنده نام دارند. سلول‌های موکوسی هشدار دهنده‌ی اپیدرم ماهیان تحت عوامل استرس‌زای محیطی و بروز بیماری‌ها و آسیب به پوست از خود واکنش نشان می‌دهند. این سلول‌ها معمولاً در لایه‌های میانی اپیدرم واقع شده‌اند و فاقد هرگونه منفذی به سطح اپیدرم هستند (Roberts 2001). از دیگر وظایف این سلول‌ها می‌توان به کمک در

التیام جراحات پوست و ترشح مواد شیمیایی به عنوان بازدارنده‌ی عوامل شکارچی و ترشح مواد حفاظتی در مقابل انگل‌ها اشاره کرد (Smith 1977, McKim and Lien 2001). به دلیل این که اجرای آزمایش‌های سیتولوژیک از نمونه‌های پوستی، یک روش تشخیصی معمول و متداول در تشخیص بسیاری از بیماری‌هاست (Stoskopf 1993) و نیز به دلیل وجود تنوع مرفولوژیک و عملکردی بسیار وسیع در ساختار بافتی پوست در بین گونه‌های مختلف ماهیان (Mittal 1997, Elliott 2000) و از آن جایی که گزارش‌های قابل توجهی در خصوص پراکنش سلول‌های جامی‌شکل اپیدرم کپور نقره‌ای بالغ در وضعیت آب و هوایی منطقه‌ی خوزستان وجود ندارد، هم‌چنین جهت تعیین دامنه‌ی پراکنش سلول‌های هشدار دهنده و ارتباط آن با جنسیت و بلوغ ماهی کپور نقره‌ای، مطالعه‌ی حاضر از اهمیت خاصی برخوردار است.

مواد و روش کار

در این پژوهش تعداد ۱۰ قطعه ماهی کپور نقره‌ای بالغ نر (۵ قطعه) و ماده (۵ قطعه) سالم با میانگین وزنی ۵/۷۱۶±۰/۵۱۹ کیلوگرم (بالای ۴ سال) در فصل بهار استفاده شد. ماهیان از مرکز پرورش ماهی شهید ملکی تهیه و به منظور جلوگیری از اتولیز، ماهیان پس از صید به طور زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از توزین و بیومتری و پس از بررسی ماکروسکوپیک (فرم بدن، رنگ و وضعیت پوست نواحی مختلف بدن) به منظور مطالعات میکروسکوپی از پوست نواحی مختلف بدن شامل سر، نواحی پشتی (زیر باله پشتی)، شکمی و دم نمونه‌هایی به ضخامت حداکثر ۵ میلی‌متر تهیه گردید و جهت تهیه‌ی مقاطع میکروسکوپیک ۵ تا ۶ میکرومتری، از روش معمول تهیه‌ی مقاطع بافتی استفاده گردید و مورد رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین- ائوزین (H&E)، رنگ‌آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف (PAS) و رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیسین بلو (AB, pH=2.5)، (AB, pH=1) و (AB, pH=2.5-PAS) قرار گرفتند (جدول ۱). به منظور مطالعات هیستوشیمی جهت مشخص کردن نوع موکوس ترشحی داخل سلول‌های جامی‌شکل اپیدرم ماهی کپور نقره‌ای، نمونه‌های بافتی مطابق جدول زیر رنگ‌آمیزی، بررسی و تفسیر شدند.

جدول ۱: رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی مورد استفاده در این پژوهش به همراه جزئیات و منابع

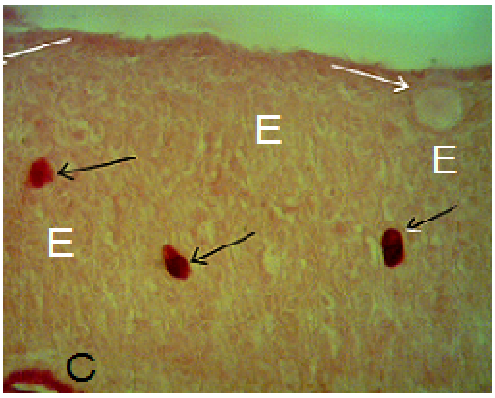
منابع	رنگ موسین واکنش نشان دهنده	موکوس واکنش نشان دهنده	روش رنگ‌آمیزی هیستوشیمی
McManus 1948	ارغوانی	موسین حاوی گلیکوپروتئین قابل اکسیداسیون و خنثی	PAS
Mowry 1956	آبی	موسین حاوی گلیکوپروتئین با گروه سولفاته و موسین حاوی گلیکوپروتئین غیر سولفاته	AB (pH=2.5)
Lev and Spicer 1964	آبی	موسین حاوی گلیکوپروتئین سولفاته	AB (pH=1)
Mowry 1963	آبی و ارغوانی	موسین حاوی گلیکوپروتئین سولفاته و غیر سولفاته موسین حاوی گلیکوپروتئین اکسیده و خنثی	AB pH= (2.5)PAS

در مطالعات هیستومتریک تعداد سلول‌های هشدار دهنده‌ی اپیدرم ماهی کپور نقره‌ای در نواحی مختلف بدن شمارش و بررسی مقایسه‌ای شدند. جهت مطالعات هیستومتری و تعیین میزان پراکنش سلول‌های هشدار دهنده، حداقل پنج برش بافتی از هر نمونه و در هر برش حداقل پنج میدان دید میکروسکوپی با عدسی شیئی ۱۰×

و در ۱۰۰ میکرومتر از طول و کل ضخامت اپیدرم هر ناحیه شمارش و بررسی شدند. برای مطالعات هیستومتری از میکروسکوپ نوری مجهز به عدسی Dino Lite و نرم افزار Dino Capture 1 استفاده گردید؛ سپس نتایج این اندازه‌گیری‌ها ثبت و به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA و TUKEY جهت مقایسه‌ی دو به دو پراکنش سلول‌ها از نظر معنی‌دار بودن یا نبودن در بین نواحی مختلف اپیدرم دو جنس نر و ماده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

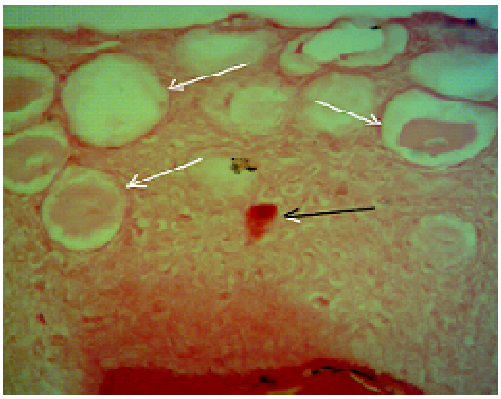
نتایج

نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که در تمام نواحی پوست علاوه بر سلول‌های قاعده‌ای استوانه‌ای و سلول‌های پوششی، سلول‌های موکوسی جامی شکل حاوی موکوس خنثی و سلول‌های موکوسی هشدار دهنده نیز در اپیدرم نواحی مختلف پوست ماهی کپور نقره‌ای وجود داشتند (تصویر ۱).



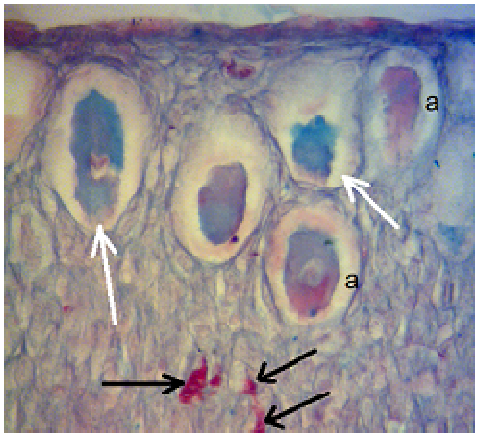
تصویر ۱: اپیدرم ناحیه‌ی سر ماهی بالغ نر (×PAS.40). سلول‌های هشدار دهنده، سلول‌هایی بزرگ، کروی تا بیضی شکل هستند (پیکان روشن) که در سطح اپیدرم و روی سلول‌های استوانه‌ای قاعده‌ای (c) و دیگرسلول‌های پوششی اپیدرم (e) قرار دارند. سیتوپلاسم وسیع این سلول‌ها روشن مشاهده می‌شود.

این سلول‌ها در لایه‌های میانی تا سطحی بافت پوششی سنگفرشی مطبق شاخی نشده اپیدرم نواحی مختلف، در میان سلول‌های استوانه‌ای قاعده‌ای قرار داشتند (تصویر ۱). سلول‌های موکوسی هشدار دهنده به دلیل شکل کروی و اندازه‌ی بزرگ به آسانی از سلول‌های جامی‌شکل قابل تشخیص بودند (تصویر ۱). این سلول‌ها در نواحی پشتی بیش‌ترین و در نواحی شکمی کم‌ترین تعداد را داشتند (جدول ۲) و به جز نواحی دم که در جنس نر و ماده از نظر تعداد برابر بودند (نمودار ۱) در سایر نواحی نسبت به همان نواحی در جنس مخالف اختلاف داشتند (نمودار ۱) اما این اختلاف در تعداد همیشه بیانگر یک اختلاف معنی‌دار نبود (جدول ۳). از ویژگی‌های منحصر به فرد این سلول‌ها که سبب شناسایی آن‌ها می‌شود، محتویات موکوسی حاوی گلیکوژن و گلیکوپروتئینی با pH خنثی و قابل اکسیداسیون است (تصویر ۲). بنابراین تنها روش شناسایی این سلول‌ها از دیگر سلول‌های ترشح کننده‌ی موکوس، استفاده و به کارگیری رنگ‌آمیزی هیستوشیمی است و برای این منظور از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی PAS و AB, pH=1 و AB, pH=2.5 استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی PAS سلول‌های جامی شکل به رنگ ارغوانی درآمدند و در میان سایر سلول‌های اپیدرمی نمایان شدند (تصویر ۲).



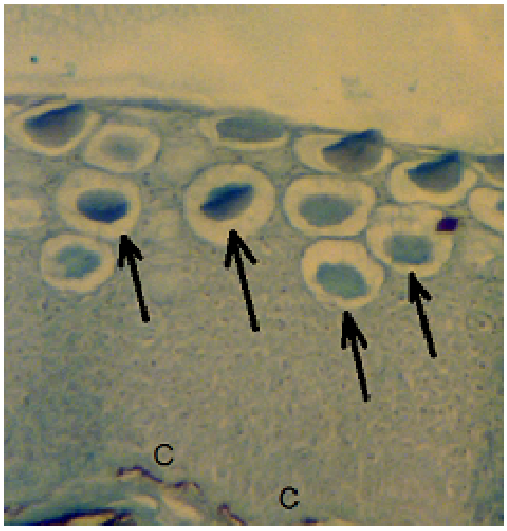
تصویر ۲: اپیدرم پوست ناحیه‌ی سر ماهی بالغ ماده (×PAS.40). سلول‌های جامی‌شکل بیش‌تر در لایه‌های میانی حاوی موکوس خنثی به رنگ PAS واکنش مثبت نشان داده و رنگ ارغوانی به خود می‌گیرند (پیکان تیره). سلول‌های هشدار دهنده با اندازه‌ی بزرگ‌تر که بیش‌تر در لایه‌های سطحی اپیدرم مشاهده می‌شوند (پیکان روشن).

تنها محتویات موکوسی حاوی گلیکوژن و گلیکوپروتئین دارای pH خنثی و قابل اکسیداسیون در رنگ‌آمیزی مذکور با معرف شیف واکنش داد و رنگ ارغوانی به خود گرفت. این سلول‌ها به رنگ‌آمیزی AB, pH=1 و AB, pH=2.5 واکنشی نشان ندادند و رنگ آبی آلسین بلو را نگرفتند. از آنجایی که در رنگ‌آمیزی AB, pH=1 محتویات موکوسی حاوی گلیکوپروتئینی با PH اسیدی و دارای گروه سولفات رنگ آبی آلسین‌بلو را می‌گیرند و هم‌چنین در رنگ‌آمیزی AB, pH=2.5 محتویات موکوسی حاوی گلیکو پروتئینی با pH اسیدی و دارای گروه سولفات و یا غیرسولفاته و کربوکسیله رنگ آبی می‌گیرند و نیز با توجه به این که این سلول‌ها تنها سلول‌های اپیدرمی کپور نقره‌ای می‌باشند که به شدت به رنگ‌آمیزی PAS واکنش داده‌اند و دارای موسین حاوی گلیکوپروتئین خنثی و قابل اکسیداسیون می‌باشند، بر اساس این واکنش‌های هیستوشیمیایی، این سلول‌ها به عنوان سلول‌های ترشح کننده‌ی موکوسی خنثی مشخص شدند. سلول‌های موکوسی خنثی در اپیدرم تمام نواحی ماهی کپور نقره‌ای وجود داشتند. این سلول‌ها در لایه‌های میانی و سطحی‌تر اپیدرم از پراکندگی بیش‌تری برخوردار بودند (تصویر ۲). اندازه‌ی این سلول‌ها کوچک‌تر از سلول‌های موکوسی هشدار دهنده بود و از نظر شکل، به شکل‌های کروی و بیضی دیده شدند (تصویر ۲). دسته‌ی دیگر سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس سلول‌های موکوسی هشدار دهنده نام دارند که در اپیدرم کپور نقره‌ای به رنگ‌آمیزی AB, pH=1 و AB, pH=2.5 واکنش مثبت نشان دادند و به دلیل محتویات موکوس حاوی گلیکوپروتئین اسیدی دارای گروه سولفات و گلیکوپروتئین اسیدی دارای گروه غیرسولفات و کربوکسیله رنگ آبی به خود گرفتند (تصویر ۳).



تصویر ۳: اپیدرم پوست ناحیه‌ی پشتی ماهی بالغ ماده (PAS-AB, pH=2.5.40×). سلول‌های جامی‌شکل حاوی موکوس خنثی در لایه‌های میانی اپیدرم به رنگ PAS واکنش مثبت نشان می‌دهند و رنگ ارغوانی به خود می‌گیرند و به راحتی از سلول‌های پوششی قابل تمایز می‌باشند (پیکان تیره) و سلول‌های هشدار دهنده‌ی حاوی موکوس اسیدی به رنگ AB واکنش مثبت نشان می‌دهند و رنگ آبی به خود می‌گیرند (پیکان روشن) و سلول‌های هشدار دهنده حاوی هر دو موسین اسیدی و خنثی هم‌زمان به رنگ‌های PAS و AB واکنش مثبت نشان می‌دهند و رنگ آبی و ارغوانی کم رنگ به خود می‌گیرند (a).

سلول‌های هشدار دهنده به دلیل اندازه‌ی درشت و سیتوپلاسم وسیع آن‌ها به آسانی از سایر سلول‌های اپیدرمی قابل شناسایی می‌باشند (تصویر ۳). سیتوپلاسم وسیع سلول‌های هشدار دهنده به رنگ‌آمیزی PAS واکنش ضعیفی نشان داد و سلول‌های هشدار دهنده حاوی هر دو موسین اسیدی و خنثی هم زمان به رنگ‌های PAS و AB واکنش مثبت نشان داده و رنگ آبی و ارغوانی کم رنگ به خود گرفتند (تصویر ۳). سلول‌های هشدار دهنده بر خلاف سلول‌های جامی شکل به رنگ آلسین‌بلو در pH=2.5 واکنش مثبت نشان دادند و آبی شدند (تصویر ۴).



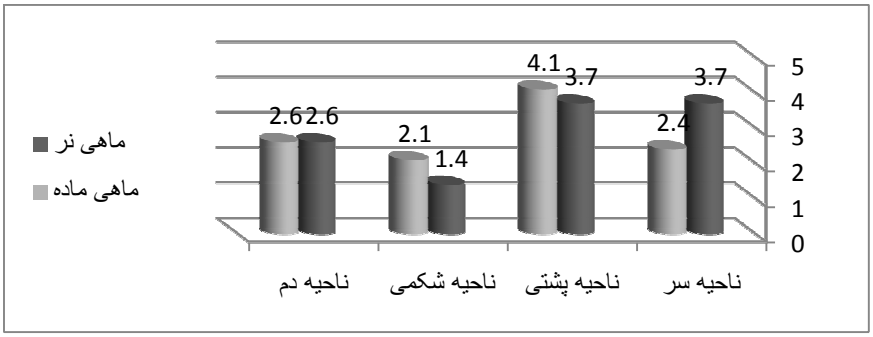
تصویر ۴: اپیدرم پوست ناحیه‌ی شکمی ماهی بالغ نر (AB, pH=2.5.40×). سلول‌های هشدار دهنده بر خلاف سلول‌های جامی‌شکل به رنگ‌آمیزی AB واکنش مثبت نشان می‌دهند و رنگ آبی به خود می‌گیرند (پیکان تیره) و سلول‌های استوانه‌ای قاعده‌ای با نظم و ترتیب بر روی غشاء پایه مستقر می‌باشند (c).

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار تعداد سلول‌های موکوسی حاوی موکوس خنثی در ۱۰۰ میکرومتر از طول و ضخامت کل اپیدرم پوست نواحی مختلف ماهی کپور نقره‌ای نر و ماده‌ی بالغ بر اساس تعداد سلول‌ها

ماهی نر		ماهی ماده	
ناحیه سر	۳/۷۱۶±۱/۶۵۵	ناحیه پشتی	۴/۱۷۶±۱/۶۸۰
ناحیه پشتی	۳/۷۱۶±۱/۸۹۷	ناحیه دم	۲/۶۹۱±۱/۲۱۱
ناحیه دم	۲/۶۳۸±۰/۸۵۲	ناحیه سر	۲/۴۰۰±۰/۶۹۵
ناحیه شکمی	۱/۴۶۵±۰/۳۸۱	ناحیه شکمی	۲/۱۲۲±۱/۱۴۰

جدول ۳: مقایسه‌ی دو به دو نواحی مختلف پوست ماهی کپور نقره‌ای بالغ نر و ماده از نظر تعداد سلول‌های موکوسی حاوی موکوس خنثی در طول ۱۰۰ میکرومتر از اپیدرم ($p<۰/۰۵$). اختلاف در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است

	سرماهی نر	ناحیه پشتی نر	ناحیه شکمی نر	دم ماهی نر	سر ماهی ماده	ناحیه پشتی ماده	ناحیه شکمی ماده	دم ماهی ماده
سرماهی نر	------	۱/۰۰۰	۰/۰۱۰	۰/۶۴۰	۰/۳۸۵	۰/۹۹۵	۰/۱۶۶	۰/۶۹۵
ناحیه پشتی نر	۱/۰۰۰	-----	۰/۰۱۰	۰/۶۴۰	۰/۳۸۵	۰/۹۹۵	۰/۱۶۶	۰/۶۹۵
ناحیه شکمی نر	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰	-----	۰/۵۳۵	۰/۷۸۴	۰/۰۰۱	۰/۹۵۹	۰/۴۷۹
دم ماهی نر	۰/۶۴۰	۰/۶۴۰	۰/۵۳۵	-----	۱/۰۰۰	۰/۲۰۲	۰/۹۸۹	۱/۰۰۰
سر ماهی ماده	۰/۳۸۵	۰/۳۸۵	۰/۷۸۴	۱/۰۰۰	-----	۰/۰۵۸	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
ناحیه پشتی ماده	۰/۹۹۵	۰/۹۹۵	۰/۰۰۱	۰/۲۰۲	۰/۰۸۵	----	۰/۰۲۶	۰/۲۳۸
ناحیه شکمی ماده	۰/۱۶۶	۰/۱۶۶	۰/۹۵۹	۰/۹۸۹	۱/۰۰۰	۰/۰۲۶	----	۰/۹۸۱
دم ماهی ماده	۰/۶۹۵	۰/۶۹۵	۰/۴۷۹	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۲۳۸	۰/۹۸۱	-----



نمودار ۱: مقایسه‌ی میانگین تعداد سلول‌های موکوسی هشدار دهنده در ۱۰۰ میکرومتر از طول اپیدرم نواحی مختلف پوست ماهی کپور نقره‌ای بالغ نر و ماده.

بحث

در سال ۱۹۸۱ با مطالعه‌ی اپیدرم پوست ماهی (*Mystus*)، بیان شد که اپیدرم، حاوی دو نوع سلول موکوسی می‌باشد و ترشحات متفاوتی دارند. نوع اول سلول‌های موکوسی جامی‌شکل که حاوی موکوس خنثی و مقاوم در برابر پیوند با ترکیبات سولفاته، گلیکوژن و اسید سیالیکی سرشار از گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد و نوع دوم سلول‌های موکوسی هشدار دهنده که حاوی مقدار بسیار کمی موکوس خنثی و سولفاته و فاقد گلیکوپروتئین‌ها است. سلول‌های موکوسی جامی‌شکل به شدت به رنگ‌آمیزی PAS واکنش مثبت نشان می‌دهند، در حالی که سلول‌های موکوسی هشدار دهنده واکنش کمی به این رنگ‌آمیزی نشان می‌دهند. این در حالی است که هر دو سلول مذکور به رنگ‌آمیزی AB (pH=2.5) واکنش مثبت نشان می‌دهند (Saxena and Kulshrestha 1981). سلول‌های موکوسی خنثی در اپیدرم ماهی کپور نقره‌ای به رنگ‌آمیزی AB (pH=1) و AB(pH=2.5) واکنش منفی نشان می‌دهند. تعداد سلول‌های جامی‌شکل ممکن است در بین جنس‌های نر و ماده‌ی یک گونه ماهی متفاوت باشد، چنان که این امر در مورد بعضی از آزاد ماهیان صادق است. فراوانی سلول‌های جامی‌شکل ممکن است بر اساس فصل و هم‌چنین در خلال فرایندهای دگردیسی نوزادان، بلوغ جنسی یا سازگاری با آب دریا نیز تغییر کند. بعضی از این تغییرات ممکن است تحت کنترل هورمونی باشند، اما نتایج متناقضی نیز گزارش شده است (Iger et al. 1994a, Iger et al. 1994b, Iger et al. 1994c, Takashi and Hibiya 1994, Stoskopf 1993, Chivers and Smith 1995, Mittal 1997 and Elliott 2000). در پژوهشی که سال ۲۰۱۲ توسط Mittal و همکاران روی اپیدرم پوست ناحیه‌ی سر ماهی *Labeo rohita* انجام گرفته، سلول‌های ترشح کننده‌ی موکوس را بر اساس مطالعات هیستوشیمی به ۴ گروه سلول‌های پوششی اپیتلیالی، سلول‌های جامی شکل نوع A، سلول‌های جامی شکل نوع B و سلول‌های موکوسی هشدار دهنده تقسیم‌بندی کردند و در نتایج تحقیق فوق بیان کردند که سلول‌های پوششی اپیتلیالی، موسین حاوی گلیکوپروتئین سولفاته و موسین حاوی گلیکوپروتئین غیرسولفاته و موسین حاوی گلیکوپروتئین قابل اکسیداسیون و خنثی (هر سه نوع موسین) را در غلظت خیلی پایینی تولید می‌کنند و در رنگ‌آمیزی‌های AB (pH=1) و AB (pH=2.5) و PAS به ترتیب آبی کم‌رنگ، آبی روشن و ارغوانی کم‌رنگ به خود می‌گیرند. سلول‌های جامی‌شکل نوع A و نوع B نیز هم‌چنین موسین حاوی گلیکوپروتئین با گروه سولفاته و موسین حاوی گلیکوپروتئین با گروه کربوکسیله و یا غیرسولفاته و موسین حاوی گلیکوپروتئین قابل اکسیداسیون و خنثی می‌باشند و (هر سه نوع موسین) را در غلظت بالاتری تولید می‌کنند و در رنگ‌آمیزی PAS هر دو سلول جامی‌شکل نوع A و نوع B رنگ ارغوانی به خود گرفته که با توجه به غلظت موکوس حاوی گلیکوپروتیین قابل

اکسیداسیون و خنثی شدت این رنگ ارغوانی کم و زیاد می‌شود. در رنگ‌آمیزی AB (pH=2.5) نیز هر دو نوع سلول جامی نوع A و B رنگ آبی به خود گرفتند که شدت این رنگ در سلول‌های جامی شکل نوع B بیش‌تر از سلول‌های جامی شکل نوع A بود و در رنگ‌آمیزی AB (pH=1) بر عکس حالت ذکر شده، هم سلول‌های جامی شکل نوع A و هم سلول‌های جامی شکل نوع B رنگ آبی به خود گرفتند، اما این بار شدت رنگ آبی در سلول‌های جامی شکل نوع A بیش‌تر از نوع B بود، زیرا سلول‌های جامی‌شکل نوع A موسین حاوی گلیکوپروتئین سولفاته بیش‌تری تولید می‌کنند. سلول‌های هشدار دهنده نیز به دلیل ترشحات بسیار ناچیز در رنگ آمیزی‌های AB (pH=1) و AB (pH=2.5) و PAS رنگ چندانی به خود نگرفتند (Rae et al. 2012). هم‌چنین Pinky و Mittal در سال ۲۰۰۸ جهت مطالعه هیستوشیمی گلیکوپروتئین‌های سلول‌های اپیدرمی ناحیه‌ی لب ماهی *Garra lamta* از رنگ‌آمیزی عمومی H&E و رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی و تکمیلی هیستوشیمی و نیز از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی AB (pH=1) و AB (pH=2.5) و PAS استفاده کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که سلول‌های جامی‌شکل به هر سه رنگ‌آمیزی واکنش مثبت نشان دادند، زیرا به نسبت‌های مختلف دارای موسین حاوی گلیکوپروتئین با گروه سولفاته و موسین حاوی گلیکوپروتئین با گروه کربوکسیله یا غیر سولفاته و موسین حاوی گلیکوپروتئین قابل اکسیداسیون و خنثی می‌باشند (Pinky and Mittal 2008) . در سال ۱۹۷۳، Pickering با مطالعه روی دو گونه ماهی سالمون گزارش داد که سلول‌های موکوسی دارای یک الگوی منظم می‌باشند و تراکم این سلول‌ها از قسمت سر با بیش‌ترین تعداد به طرف قسمت دم بدن ماهی با کم‌ترین تراکم کاهش می‌یابد، چرا که در حرکت شنای ماهی به سمت جلو موکوس قسمت‌های جلوی پوست ماهی به قسمت‌های عقب جا به جا می‌شود. در نتیجه نواحی عقبی پوست بدن ماهی موکوس را از نواحی جلویی دریافت می‌کنند، اما قسمت‌های جلویی، موکوس را فقط از سلول‌های موکوسی اپیتلیوم خودشان تهیه می‌کنند و احتمال دارد به تعداد بیش‌تری سلول موکوسی در اپیتلیوم خود نیاز داشته باشند (Pickering 1973). نتایج هیستومتریک این پژوهش نیز نشان داد سلول‌های موکوسی خنثی ماهی کپور نقره‌ای نر بالغ در ناحیه‌ی سر بیش‌ترین تعداد را دارند. هم‌چنین Pickering در سال ۱۹۷۷ در تحقیقی با عنوان اثر تغییرات فصلی در اپیدرم قزل‌آلای قهوه‌ای نشان داد که ضخامت اپیدرم و تعداد سلول‌های ترشح کننده‌ی موکوس دستخوش تغییرات مشخصی در دوره‌های متوالی تخم‌ریزی می‌شود. در طول زمان تخم‌ریزی (دسامبر و جولای) کاهش شدیدی در غلظت سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس اپیدرم مشاهده می‌شود و دلیل این تغییرات احتمالاً به عوامل هورمونی بستگی دارد که اپیدرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، بیش‌ترین تعداد سلول‌های موکوسی خنثی در ماهی کپور نقره‌ای در جنس نر در ناحیه‌ی سر و در جنس ماده در ناحیه‌ی پشتی قرار دارند و تعداد این سلول‌ها در ناحیه‌ی دمی پوست ماهیان نر و ماده تقریباً یکسان است. محققین تفاوت‌هایی از قبیل اختلاف در ضخامت اپیدرم و نیز اختلاف در تعداد سلول‌های اپیدرمی میان دو جنس نر و ماده‌ی بالغ یک گونه ماهی را به عوامل هورمونی که اپیدرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند، وابسته می‌دانند. Burto و Fletcher در سال ۱۹۸۳، در تحقیقی با عنوان تغییرات فصلی در اپیدرم جمعیت ساحلی کفشک زمستانی در منطقه‌ی Walbaum ثابت کردند در طول پاییز و کمی قبل از شروع زمستان در آوریل و می و قبل از تخم‌ریزی افزایش معنی‌داری در فراوانی سلول‌های ترشح‌کننده‌ی موکوس اتفاق افتاده که در جنس ماده بیش‌تر از جنس نر مشهود است. فراوانی سلول‌های ترشح کننده‌ی موکوس در اواسط زمستان (June-March) زمانی که فعالیت معمول در ماهی پایین است، کاهش می‌یابد (Burto and Fletcher 1983).

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت پشتیبانی و تأمین هزینه‌های این طرح، از همکاری‌های ارزنده‌ی جناب آقای دکتر سیدرحیم مغینمی مدیریت محترم شیلات استان خوزستان، جناب آقای مهندس میرزایی مدیریت مرکز پرورش ماهی شهید ملکی، هم‌چنین جناب آقای رحمن ایرانشاهی کارشناس بخش بافت‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

ستاری، مسعود (۱۳۸۲). ماهی شناسی، انتشارات حق شناس، جلد اول، چاپ دوم، صفحات ۷۴-۵۹ و ۵۸۶-۵۶۳.

Alexander, J.B. and Ingram, G.A. (1992). Non cellular non-specific defence mechanisms of fish. Annval Review Fish Disease, 2: 249-279.

Burton, D. and Fletcher, G.L. (1983). Seasonal changes in the epidermis of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom, 63 (2): 273-287 .

Chivers, D.P. and Smith, R.J.F. (1995). Fathead minnows *(Pimephales promelas*) learn to recognize chemical stimuliform high-risk habitats by the presence of alarm substance. Behavior Ecology, 6: 155-158.

Elliott, D.G. (2000). Integumentary system. *In*: ostrander, G.K. (Ed). The Laboratory Fish, Academic Press, New York, USA. pp: 95-109, 219-220, 271-307, 463-479.

Fast, M.D.; Sims, D.E.; Burka, G.F.; Mustafa, A. and Ross, N.W. (2002). Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucous and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 132(3): 645-657.

Iger, Y. ; Abraham, M. and Wendelaar-Bonga, S.E. (1994a). Response of club cells in the skin of the carp, *Cypinus carpio*, to exogenous stressors. Cell and Tissue Research. 277:485-491.

Iger, Y.; Jenner, H.A. and Wendelaar-Bonga, S.E. (1994b). Cellular response in the skin of the trout, *Oncorhynchuss mykiss*, exposed to temperature elevation. Journal of Fish Biology, 44(6): 921-935.

Iger, Y.; Jenner, H.A. and Wendelaar-Bonga, S.E. (1994c). Cellular response in the skin of the rainbow trout, *Oncorhynchuss mykiss*, exposed to Rhine water. Journal of Fish Biology, 45(6): 1119-1132.

Kaweewat, K. and Hofer, R. (1997). Effect of UV-B radiation on gablet cells in the skin of different fish species. Journal of Phot Hochemistry and Photobiology, Part B: Biology, 41: 222-226.

Kosuga, Y.; Mano, N. and Hirose, H. (2000). Bacterial agglutinins in the skin mucus of Japanese eel. Fish Pathology, 35: 73-77.

Lev, R. and Spicer, S. (1964). Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 12, 309.

McKim, J.M. and Lien, G.J. (2001). Toxic responses of the skin *In*: Schlenk, D. and Benson, W .H. (Eds). Target Organ Toxicity in Marine and Fresh water Teleost. Taylor & Francis. Vol. 1, pp:151-224.

McManus, J. F. A. (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technology. 23, 99-108.

Mittal, A.K. (1997). Fish epidermis. *in*: Sing B.R. (*Ed*). Advances in Fish Research, Narendra Publishing House, Delhi, India, Vol. 2, pp: 43-62.

Mowry, R.W. (1956). Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 4, 407–408.

Mowry, R.W. (1963). The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins with revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue 8GX, and their combination with the periodic acid-Schiff reaction. Annals of the New York Academy of Sciences. 106, 402-423.

Nakamura, O.; Saeki, M.; Kamiya, I.; Muramoto, K and Watanabe, T. (2002). Development of epidermal and mucusal galectin containing cells in metamorphosing leptocephali of Japanese conger. Journal of Fish Biology, 61(31): 822-833.

Pickering, A.D. (1977). Seasonal changes in the epidermis of the brown trout Salmo trutta (L.), Journal of Fish Biology, 10 (6): 561-566 .

Pickering, A.D. (1973). The distribution of mocus cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* and the char *Salvelinus alpinus* (L.). Journal Fish Biology, 6: 111-118.

Pinky, S.; Mittal, S.; Mittal, A.K. (2008). Glycoproteins in the Epithelium of Lips and Associated Structures of a Hill Stream Fish *Garra lamta* (Cyprinidae, Cypriniformes): A Histochemical Investigation. Anatomy, Histology and Embryology. 37: 101–113.

Rai, A.K., Srivastava, N.; Kumari, U.; Mittal, S. and Mittal, A.K. (2012). Histochemical analysis of glycoproteins in the secretory cells in the epidermis of the head skin of Indian Major Carp, *Labeo rohita*. Tissue and Cell, 44: 409–417.

Roberts, R.G. (2001). Fish pathology. 3rd ed., W . B. Saunders Co., PP:12-14, 62-65, 133, 144.

Saxena, M. and Kulshrestha, S.K. (1981). Histochemistry and Cell Biology. Histochemical studies of mucosubstances in the epidermis of a nonscaly teleost Mystus (Mystus) vittatus BI. (Pisces-bagridae), 72: 155-160.

Smith, R.J.F. (1977). In Chemical Signals in Vertebrates (eds D. Muller-Schawars and M.M.Mozel), pp: 303-320, Plenum, New Yoek, *In: The laboratory Fish, Ostrander, G. K. 2000, Academic Press.*

Stoskopf, M.K. (1993). Fish medicine. W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA. pp: 31-33.

Takashi, F. and Hibiya, T. (1994). An Atlas of Fish Histology: normal and pathological features. 2nd *ed*., Collage of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Tokyo, japan. pp: 8-15.

Whitear, M. (1986). The skin of fishes including cyclostomes epidermis and dermis. *In*: Bereiter-Hahn, J., Maltoltsy, A. G. and Richards, K. S. (Eds*).* Biology of the Integument. Vertebrates, Berlin, Vol. 2, pp: 8-64.

Distribution and histochemical studies of Goblet mucous cells in different regions of epidermis in mature male and female Silver carp fish

Erfani Majd, N.[1]; Mesbah, M.[2] and Esfandiary, K.[3]

Received: 02.07.2013 Accepted: 04.11.2013

Abstract

Fish epidermis contains goblet mucous cells which their primary function is to secrete mucous to skin. For histometrical and histochemical studies of these cells, at least 10 mature male and female *silver carp* fish were selected and 5 mm thickness samples were taken from different parts of skin including head, dorsum, region, venter region and tail. 5-6µ sections were made using paraffin embedding methods, and stained by H&E, PAS, AB (pH=2.5), AB (pH=1) and AB (pH=2.5) PAS. Number of goblet cells were counted in 100 µm length of epidermis in each regions. The results showed that there are small and ellipsoid to polyhedral cells called goblet cells in different regions of silver carp epidermis. These cells have positive reaction to PAS staining which it showing the neutral property of mucous secretion of these cells. The skin of silver carp fish can be divided on the basis of goblet cells distribution in different parts of epidermis (head, dorsal regions, ventral regions and tail). The results revealed that male silver carp fish has maximum goblet cells in head skin but the female has maximum in dorsal skin. The number of these cells in tail part of male and female are relatively same.

Key words: Histometry, Histochemistry, Goblet cells, Epidermis, Silver carp

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

2- Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

3- MSc. Student of Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

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