

مطالعه‌ی ساختار هیستولوژی و میکرومتری بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش (GALT) ماهی کپور نقره‌ای بالغ و نابالغ

نعیم عرفانی‌مجد^{۱*}، رحیم پیغان^۲ و زینب یعقوبی^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۴

چکیده

بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش (GALT) جزء بافت‌های لنفوئیدی اولیه‌ی پستانداران به شمار می‌آید و بخشی از سیستم لنفوئیدی مخاطی محسوب می‌شود و این بافت اولین سد دفاعی بدن در مقابل عوامل پاتوژن بلعیده شده، می‌باشد. گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود اختلافات ساختاری در بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش در بین گونه‌های مختلف ماهیان و همچنین نواحی مختلف لوله‌ی گوارش یک ماهی وجود دارد. در این پژوهش جهت مطالعه بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش از ابتدای حباب روده‌ای تا انتهای روده‌ی اصلی (رکتوم)، تعداد ۱۰ عدد ماهی کپور نقره‌ای بالغ (۵ عدد) و نابالغ (۵ عدد) نمونه‌هایی به ضخامت حداکثر ۰/۵ سانتیمتر برداشت و پس از طی روش‌های استاندارد تهیه مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه و مورد رنگ‌آمیزهای H&E و PAS قرار گرفتند. نتایج مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که بافت لنفوئیدی در نواحی مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای در سه منطقه و به دو شکل وجود دارد. منطقه اول، حضور پراکنده‌ی سلول‌های لنفوئیدی در داخل بافت پوششی و منطقه دوم، حضور سلول‌های لنفوئیدی به شکل ساختارهای ستونی شکل یا به شکل توده‌های سلولی در پارین و منطقه سوم، حضور سلول‌های لنفوئیدی به شکل پراکنده در زیر مخاط می‌باشد. سلول‌های لنفوئیدی عمدتاً از سلول‌های لنفوسیت، لنفوبلاست و به تعداد کمتری از سلول‌های پلازما سل و ماکروفاژ تشکیل شده‌اند. نتایج هیستومتری نشان داد که بین بخش‌های مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای، پراکنش و تراکم سلول‌های لنفوسیتی داخل پوششی در هر یک از دو نوع ماهیان بالغ و نابالغ اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.05$). بیشترین تعداد سلول‌های لنفوسیتی داخل پوششی در هر دو ماهی بالغ و نابالغ، در حباب روده‌ای و بخش خلفی روده‌ی اصلی مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: هیستومورفومتری، بافت لنفوئیدی ضمیمه دستگاه گوارش (GALT)، حباب روده‌ای، روده، کپور نقره‌ای

مقدمه

گرانوسیت‌ها تشکیل می‌دهند و به طور کلی این بافت لنفوئیدی را به عنوان یک سد روده‌ای^۱ بیان نموده‌اند (Ardavin et al. 1982). بافت لنفوئیدی داخل بافت پوششی به عنوان اولین سد دفاعی در لوله‌ی گوارش ماهی شناخته شده است و نقش مهم آن در ایجاد ایمنی و افزایش تحریک آنتی‌ژنی پایدار مورد توجه مطالعات ایمونولوژیک شده است (Bozic 1999). ماهیان استخوانی فاقد بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش به صورت مجتمع مشابه پلاک‌های پی‌یر در پستانداران هستند ولی دارای دو

در سال‌های اخیر، هر چند دستگاه ایمنی ماهیان به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است، اما ایمنی موضعی در دستگاه‌هایی مانند دستگاه تناسلی، پوست و لوله‌ی گوارش کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Hart and Wrathmell 1988). اجتماع سلول لنفوئیدی در سراسر بافت همبند لوله‌ی گوارش دوزیست *Pleurodeles waltlii* وجود دارد. بیش‌ترین تعداد این سلول‌ها را سلول‌های لنفوسیت کوچک و متوسط و پس از آن سلول‌های پلازما سل در حال تکامل، ماکروفاژها و

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: naeemalbo@yahoo.com

^{۱*} استاد گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۲ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد بافت‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

وزنی $1141/60 + 152/70$ گرم و میانگین طولی $38/60 + 1/94$ سانتی‌متر و 5 عدد ماهی بالغ (بالای 4 سال) با میانگین وزنی $6000 + 524/40$ گرم و میانگین طولی $70 + 1/41$ سانتی‌متر در فصل بهار مورد استفاده قرار گرفت. ماهیان از مرکز پرورش شهید ملکی^۱ تهیه و به منظور جلوگیری از عمل اتولیز، ماهیان پس از صید به طور زنده به آزمایشگاه منتقل شدند.

در آزمایشگاه پس از توزین، بیومتری و بررسی ماکروسکوپی ماهیان و روده‌ها، به منظور مطالعات میکروسکوپی از ابتدای حباب روده‌ای تا انتهای روده‌ی اصلی (رکتوم) نمونه‌هایی به ضخامت $0/5$ سانتی‌متر برداشت و به روش معمول تهیه مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت $6-5$ میکرومتر تهیه و مورد رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین - انوزین و پرئودیک اسید شیف (PAS) قرار گرفتند. جهت مطالعات هیستومتری و تعیین میزان پراکنش سلول‌های لنفوسیتی داخل پوششی، پارین و زیرمخاط نواحی مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای، 5 برش بافتی از هر نمونه و در هر برش حداقل پنج میدان دید میکروسکوپی با عدسی شیئی $40\times$ و در 100 میکرومتر از طول و کل ضخامت بافت پوششی مخاط هر ناحیه مورد شمارش و بررسی قرار گرفتند. برای مطالعات هیستومتری از میکروسکوپ نوری مجهز به عدسی دیجیتال Dino Lite و نرم‌افزار Dino Capture 1 استفاده گردید. سپس نتایج این اندازه‌گیری‌ها ثبت و به وسیله نرم‌افزار SPSS جهت مقایسه‌ی پراکنش سلول‌های لنفوسیتی داخل پوششی در هر ناحیه از حباب روده‌ای و روده‌ی اصلی ماهی کپور نقره‌ای مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و آزمون (TUKEY) جهت مقایسه دو به دو و از نظر معنی‌دار بودن یا نبودن و اختلاف پراکنش سلول‌های لنفوسیتی داخل پوششی بین نواحی مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای در دو گروه ماهی بالغ و نابالغ استفاده گردید.

منطقه‌ی لنفوئیدی اصلی شامل بافت لنفوئیدی پارین (LPL) و بافت لنفوئیدی داخل پوششی (IEL) هستند (Rombout et al. 1993). اما گزارش‌های اندکی در خصوص وجود بافت لنفوئیدی مجتمع سازمان یافته، تحت عنوان پلاک پی‌یر وجود دارد (Mc Millan and Secombes 1997). بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش جزء بافت‌های لنفوئیدی اولیه به شمار آمده و بخشی از سیستم لنفوئیدی مخاطی محسوب می‌شود (Press and Evensen 1999). حضور بافت لنفوئیدی در پارین و بافت لنفوئیدی داخل پوششی در اکثر ماهیان استخوانی مشاهده شده است (Mc Millan and Secombes 1997, Rombout et al. 1993). محققین متعددی در بررسی‌های خود نشان داده‌اند که بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش نواحی مختلف لوله‌ی گوارش دارای تفاوت‌های ساختاری قابل توجهی می‌باشند (Abelli 1997). هم‌چنین گزارش‌های بسیاری در مورد وجود اختلاف آشکار در ساختار بافت لنفوئیدی و عملکرد سیستم ایمنی ماهیان در فصول مختلف سال وجود دارد (Alcorn et al. 2000, Bly and Clem 1992). با توجه به اینکه ماهی کپور نقره‌ای از گونه‌های با ارزش اقتصادی بالا در منطقه‌ی خوزستان بوده و به صورت پرورشی نیز تکثیر می‌گردد و نظر به اینکه اطلاعاتی از ساختار بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش (GALT) در نواحی مختلف لوله‌ی گوارش کپور نقره‌ای بالغ و نابالغ در شرایط آب و هوایی منطقه‌ی خوزستان وجود ندارد، هم‌چنین جهت تعیین دامنه‌ی تغییرات تراکم و پراکندگی سلول‌های لنفوئیدی و ارتباط آن با بلوغ ماهی کپور نقره‌ای، مطالعه‌ی حاضر از اهمیت خاصی برخوردار است.

مواد و روش کار

در این پژوهش تعداد 10 قطعه ماهی کپور نقره‌ای بالغ و نابالغ شامل 5 عدد ماهی نابالغ (زیر 2 سال) با میانگین

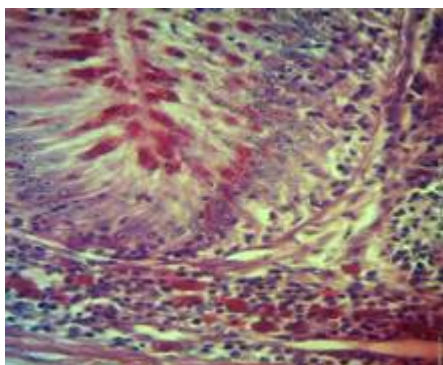
۱- در 15 کیلومتری جنوب غربی جاده اهواز - خرمشهر قرار دارد.

نتایج

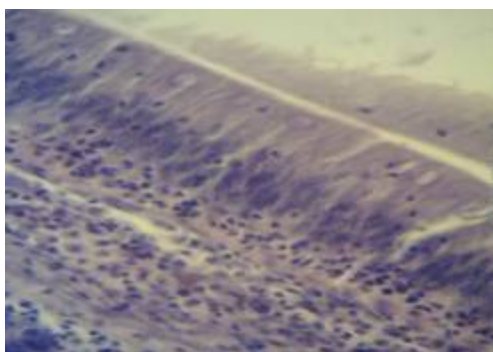
هیستولوژی

نتایج به دست آمده نشان داد که پارین و زیرمخاط لوله‌ی گوارش ماهی کپور نقره‌ای از بافت همبند سستی تشکیل شده که توسط یک لایه عضله‌ی مخاطی ظریف در حباب روده‌ای و یک لایه عضله‌ی مخاطی ضخیم‌تر در نواحی خلفی روده‌ی اصلی، از هم جدا شده‌اند و سلول‌های لنفوئیدی شامل سلول‌های لنفوسیت، لنفوبلاست، ماکروفاژ و پلاسماسل به تعداد قابل توجهی در آن‌ها حضور دارند (تصویر ۱). مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که بافت لنفوئیدی در نواحی مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای ماهی کپور نقره‌ای در سه ناحیه و به دو شکل وجود دارد. ناحیه‌ی اول، حضور سلول‌های لنفوئیدی در بافت داخل پوششی و به شکل منتشر یا ستونی شکل در بین سلول‌های پوششی می‌باشد و ناحیه‌ی دوم، حضور سلول‌های لنفوئیدی در پارین و بالاتر از شبکه‌ی مویرگی می‌باشد، که در ناحیه‌ی پارین، سلول‌های لنفوئیدی دارای یک آرایش ستونی شکل و هم‌چنین به شکل توده‌های سلولی می‌باشند. ناحیه‌ی سوم، حضور سلول‌های لنفوئیدی در زیر مخاط به صورت پراکنده می‌باشد. از یافته‌های قابل توجه، آرایش سلول‌های لنفوسیتی در بافت داخل پوششی در حباب روده‌ای و بخش چهارم و پنجم روده‌ی اصلی در ماهیان بالغ و حباب روده‌ای و بخش پنجم روده‌ی اصلی ماهیان نابالغ به صورت ساختارهای ستونی شکل است که تا حدود دو سوم بافت پوششی امتداد دارند. هم‌چنین سلول‌های لنفوسیتی به صورت پراکنده تا سطح بافت پوششی نیز امتداد دارند (تصویر ۲). یک شبکه‌ی ظریف مویرگی سراسری در زیر غشاء پایه بافت پوششی وجود دارد که این شبکه در بخش پنجم روده‌ی اصلی ماهیان بالغ به صورت یک شبکه‌ی مویرگی وسیع مشاهده گردید (تصویر ۳). در بین سلول‌های استوانه‌ای، سلول‌های موکوسی نیز مشاهده گردید (تصویر ۴). یافته‌ی قابل توجه

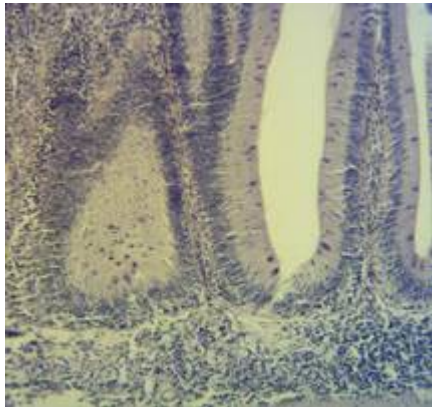
دیگر، تراکم بیش‌تر سلول‌های لنفوئیدی در بافت پوششی مخاط و در زیرمخاط می‌باشد. هرچند بافت زیرمخاط در ماهیان بالغ، وسعت بیش‌تری داشت ولی سلول‌های لنفوئیدی آن به طور قابل توجهی کم‌تر و به طور وسیعی پراکنده می‌باشد (تصاویر ۵ و ۶). تجمع کوچکی از فولیکول‌های لنفی در طول لوله‌ی گوارش ماهی کپور نقره‌ای مشاهده گردید که می‌تواند بیانگر وجود پلاک پی‌یر باشد (تصویر ۷).



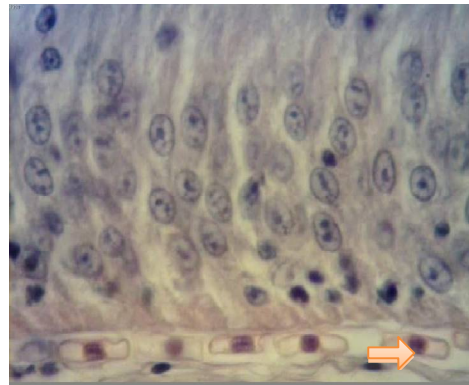
تصویر ۱: ساختار بافتی حباب روده‌ای ماهی کپور نقره‌ای نابالغ (PAS, $\times 40$). عضله‌ی مخاطی به صورت یک لایه‌ی ظریف (پیکان) که در بالای آن پارین همراه با سلول‌های لنفوسیتی نسبتاً متراکم، پراکنده قابل مشاهده است. هم‌چنین سلول‌های لنفوسیتی به صورت توده‌های متراکم در طبقه‌ی زیر مخاط قابل مشاهده است.



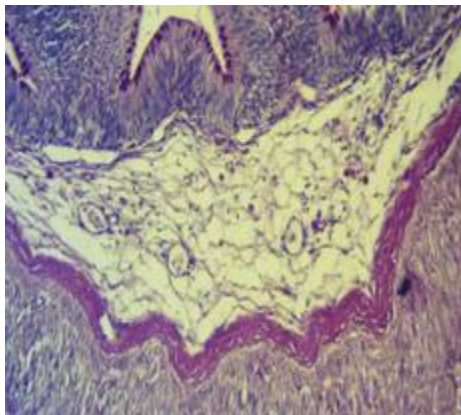
تصویر ۲: بافت لنفوئیدی داخل بافت پوششی و پارین روده‌ی اصلی ماهی کپور نقره‌ای ($\times 40$, H&E). سلول‌های لنفوسیتی با آرایش ستونی (پیکان) در داخل بافت پوششی و پارین و هم‌چنین به صورت توده‌های سلولی در پارین قابل مشاهده است. سلول‌های لنفوئیدی در طبقه‌ی زیر مخاط نیز به صورت پراکنده قابل مشاهده است.



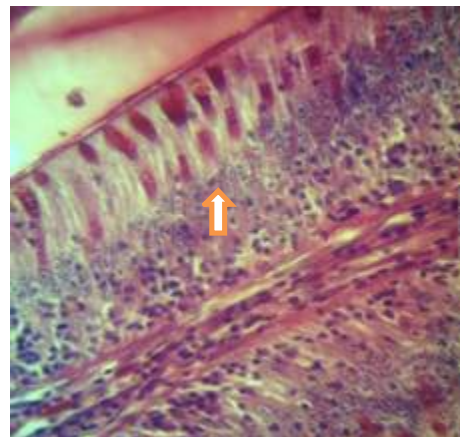
شکل ۵: بافت لنفونیدی در طبقه مخاط و زیرمخاط ماهی کپور نقره‌ای نابالغ ($H\&E, \times 10$). تراکم سلول‌های لنفونیدی در بافت پوششی ماهیان نابالغ افزایش یافته و زیرمخاط (پیکان) این ماهیان دارای ضخامت بیش‌تر و بافت لنفونیدی متراکمی می‌باشد.



تصویر ۳: ساختار بافتی مخاط روده‌ی اصلی ماهی کپور نقره‌ای بالغ ($H\&E, \times 100$). شبکه مویرگی به صورت یک لایه‌ی وسیع (پیکان) در زیر بافت پوششی قابل مشاهده است. این شبکه در بخش پنجم روده‌ی اصلی ماهیان بالغ به صورت وسیعی قابل مشاهده است.



شکل ۶: بافت لنفونیدی در طبقه مخاط و زیرمخاط ماهی کپور نقره‌ای بالغ ($PAS, \times 10$). تراکم سلول‌های لنفونیدی در بافت پوششی ماهیان بالغ کاهش یافته و زیرمخاط (پیکان) این ماهیان وسعت بیش‌تری پیدا کرده ولی بافت لنفونیدی قابل توجهی ندارد و بخش اعظم آن شامل عروق خونی و بافت چربی می‌باشد.



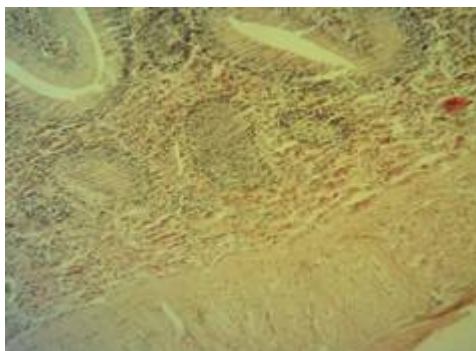
تصویر ۴: ساختار بافتی بخشی از مخاط روده‌ی اصلی ماهی کپور نقره‌ای ($PAS \times 40$). سلول‌های موکوسی خنثی (پیکان) دارای واکنش مثبت (ارغوانی رنگ) در بین سلول‌های استوانه‌ای قابل توجه می‌باشد. همچنین حضور سلول‌های لنفوسیتی به صورت پراکنده تا سطح بافت پوششی قابل مشاهده است.

بخش‌های مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای بین ماهیان بالغ و نابالغ، اختلاف معنی‌دار بوده به طوری که بیش‌ترین تعداد سلول لنفوسیتی در زیرمخاط حباب روده‌ای ماهیان نابالغ ($46/52 \pm 3/45$ عدد) و کم‌ترین تعداد در بخش پنجم روده‌ی اصلی ماهیان بالغ ($16/37 \pm 2/81$ عدد) می‌باشد. در مقایسه‌ی پراکنش و تراکم تعداد سلول‌های لنفوسیتی در زیر مخاط نواحی مختلف روده اصلی و حباب روده‌ای بین ماهیان بالغ و نابالغ اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید، اما در بخش دوم روده‌ی اصلی بین ماهیان نابالغ ($31/42 \pm 2/65$ عدد) و ماهیان بالغ ($27/95 \pm 4/15$ عدد) اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P > 0/05$).

یافته‌ی قابل توجه، افزایش تعداد سلول‌های لنفوسیتی بافت پوششی پارین و داخل پوششی در بخش پنجم روده‌ی اصلی نسبت به سایر بخش‌ها در ماهیان بالغ و نابالغ می‌باشد که این اختلافات در سطح $0/05$ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲).

یافته‌ی قابل توجه دیگر در مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لنفوسیتی داخل پوششی بین نواحی مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای ماهیان نابالغ، اختلاف معنی‌داری است. تنها بین بخش سوم و چهارم روده‌ی اصلی، اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد ($P > 0/05$) (جدول ۱). هم‌چنین در مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لنفوسیتی بافت پارین بین نواحی مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای ماهیان نابالغ، اختلاف معنی‌داری است، تنها بین بخش اول با دوم و هم‌چنین بخش دوم با سوم روده‌ی اصلی، اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0/05$) (جدول ۲).

در مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لنفوسیتی داخل پوششی بین نواحی مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای ماهیان بالغ، بین تمام بخش‌ها اختلاف معنی‌دار است تنها بین بخش دوم و سوم این اختلاف، معنی‌دار نیست ($P > 0/05$) (جدول ۱). هم‌چنین در مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لنفوسیتی بافت پارین بین نواحی مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای ماهیان بالغ، بین بخش اول با دوم و هم‌چنین بخش دوم با سوم اختلاف، معنی‌دار نیست ($P > 0/05$) (جدول ۲).



شکل ۷: ساختار بافتی زیر مخاط بخش خلفی روده‌ی اصلی ماهی کپور نقره‌ای بالغ ($H&E \times 10$). تجمع فولیکول‌های لنفی در طبقه‌ی زیرمخاط روده به صورت پلاک پی‌یر قابل توجه می‌باشد.

نتایج هیستومتری

تعداد سلول‌های لنفوسیتی داخل پوششی در 100 میکرومتر از طول بافت پوششی مخاط بخش‌های مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای بین ماهیان بالغ و نابالغ کپور نقره‌ای، دارای اختلاف معنی‌دار بوده، به طوری که بیش‌ترین تعداد سلول لنفوسیتی در بخش پنجم روده‌ی اصلی ماهیان نابالغ ($22/90 \pm 1/06$ عدد) و کم‌ترین آن در بخش اول روده‌ی اصلی ماهیان بالغ ($4/59 \pm 0/82$ عدد) می‌باشد. در مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لنفوسیتی بخش‌های مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای بین ماهیان بالغ و نابالغ، در حباب روده‌ای، بخش اول، سوم و پنجم روده‌ی اصلی اختلاف معنی‌داری است ($P < 0/05$)، (جدول ۱).

با توجه به جدول ۲، تعداد سلول‌های لنفوسیتی بافت پارین در 100 میکرومتر از طول مخاط بخش‌های مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای بین ماهی بالغ و نابالغ اختلاف معنی‌دار بوده به طوری که بیش‌ترین تعداد سلول لنفوسیتی در بخش پنجم روده‌ی اصلی ماهیان نابالغ ($74/62 \pm 7/07$ عدد) و کم‌ترین آن در بخش اول روده‌ی اصلی ماهیان بالغ ($17/22 \pm 5/01$ عدد) می‌باشد.

در مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لنفوسیتی بخش‌های مختلف روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای بین ماهیان بالغ و نابالغ، در تمام بخش‌های روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای اختلاف معنی‌داری است ($P < 0/05$).

هم‌چنین با توجه به جدول ۳، تعداد سلول‌های لنفوسیتی در مساحت $5000 \mu m^2$ از بافت زیرمخاط

جدول ۱: مقایسه‌ی تعداد پراکنندگی سلول‌های لنفوسیت داخل پوششی در نواحی مختلف لوله‌ی گوارش ماهی کپور نقره‌ای در طول ۱۰۰ میکرومتر از ضخامت بافت پوششی ماهیان نابالغ و بالغ ($M \pm SD$)

سطح اختلاف	بالغ	نابالغ	ماهی مورد مطالعه ناحیه مورد مطالعه
۰/۰۱۷*	^{ab} ۱۵/۶۱±۲/۵۰	^a ۱۹/۷۵±۱/۰۸	حباب روده‌ای
۰/۰۰۱*	^{bc} ۴/۵۹±۰/۸۲	^b ۷/۰۷±۰/۷۱	بخش اول (I ₁)
۰/۷۹۸	^{cd} ۹/۰۳±۱/۲۶	^c ۹/۲۱±۰/۷۶	بخش دوم (I ₂)
۰/۰۰۳*	^{cd} ۱۰/۵۰±۱/۴۳	^d ۱۳/۶۶±۰/۹۵	بخش سوم (I ₃)
۰/۲۰۹	^{de} ۱۲/۸۲±۱/۶۷	^d ۱۴/۱۴±۱/۳۶	بخش چهارم (I ₄)
۰/۰۰۱*	^{ac} ۱۷/۱۱±۲/۱۵	^e ۲۲/۹۰±۱/۰۲	بخش پنجم (I ₅)

* اختلاف در سطح ۰/۰۵ معنی دار است.

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

جدول ۲: مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لنفوسیت بافت پارین نواحی مختلف لوله‌ی گوارش ماهی کپور نقره‌ای در طول ۱۰۰ میکرومتر از مخاط بافت روده بین ماهیان نابالغ و بالغ ($M \pm SE$)

سطح اختلاف	بالغ	نابالغ	ماهی مورد مطالعه ناحیه مورد مطالعه
۰/۰۰۲*	^{ab} ۴۷/۴۰±۴/۲۰	^a ۶۱/۰۲±۵/۰۶	حباب روده‌ای
۰/۰۰۶*	^{ac} ۱۷/۲۲±۵/۰۱	^b ۳۰/۲۹±۵/۹۶	بخش اول (I ₁)
۰/۰۱۱*	^{ac} ۲۶/۱۴±۶/۲۶	^b ۳۹/۴۹±۶/۶۴	بخش دوم (I ₂)
۰/۰۱۸*	^{ac} ۳۳/۲۳±۷/۶۷	^b ۴۹/۱۴±۶/۰۴	بخش سوم (I ₃)
۰/۰۱۴*	^{bc} ۴۵/۴۳±۹/۴۲	^c ۶۲/۴۳±۷/۷۵	بخش چهارم (I ₄)
۰/۰۱۷*	^{cd} ۵۸/۲۷±۹/۹۹	^d ۷۴/۶۲±۷/۰۷	بخش پنجم (I ₅)

* اختلاف در سطح ۰/۰۵ معنی دار است.

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

جدول ۳: مقایسه‌ی تعداد سلول‌های لنفوتیدی بافت زیر مخاط نواحی مختلف لوله‌ی گوارش در ماهی کپور نقره‌ای در مساحت $5000 \mu m^2$ از ضخامت بافت زیر مخاط بین ماهیان نابالغ و بالغ ($M \pm SE$)

سطح اختلاف	بالغ	نابالغ	ماهی مورد مطالعه ناحیه مورد مطالعه
۰/۰۱۳*	۳۷/۱۲±۶/۵۳	۴۶/۵۲±۳/۴۵	حباب روده‌ای
۰/۰۱۰*	۳۰/۱۷±۷/۲۷	۴۰/۲۴±۲/۴۶	بخش اول (I ₁)
۰/۱۲۱	۲۷/۹۵±۴/۱۵	۳۱/۴۲±۲/۶۵	بخش دوم (I ₂)
۰/۰۰۷*	۲۲/۲۰±۴/۱۰	۲۹/۶۸±۲/۹۸	بخش سوم (I ₃)
۰/۰۰۴*	۱۹/۰۲±۳/۷۲	۲۷/۹۴±۳/۷۳	بخش چهارم (I ₄)
۰/۰۱۳*	۱۶/۳۷±۲/۸۱	۲۲/۱۴±۳/۲۱	بخش پنجم (I ₅)

* اختلاف در سطح ۰/۰۵ معنی دار است.

بحث

رأسی سلول‌های روده‌ای مشاهده نمی‌گردد. نیکبخت در سال ۱۳۸۶ در مطالعه روی ماهی بنی گزارش کردند، که سلول‌های لنفوسیتی، علاوه بر ناحیه‌ی قاعده‌ای در بالای هسته و نیمه‌ی فوقانی سلول‌های روده‌ای نیز حضور دارند. نتایج به دست آمده نشان داد که پارین (PL) و زیرمخاط لوله‌ی گوارش ماهی کپور نقره‌ای از بافت همبند سستی تشکیل شده که توسط یک لایه عضله‌ی مخاطی ظریف در نواحی قدامی حباب روده‌ای و یک لایه عضله-ی مخاطی ضخیم‌تر در نواحی خلفی روده از هم جدا شده‌اند و سلول‌های لنفوئیدی شامل سلول‌های لنفوسیت، لنفوبلاست، ماکروفاژ و پلاسماسل به تعداد قابل توجهی در آن حضور دارند. Robert و Donald در سال ۱۹۸۶ جمعیت سلولی شامل سلول‌های لنفوسیت با اندازه‌ی متوسط و کوچک، لنفوبلاست، ماکروفاژ و انواع سلول‌های گرانولوسیت را در LP گزارش نمودند و بیش‌ترین انواع سلول‌های گرانولوسیت سلول‌های ماست سل است که حاوی گرانول‌های بزرگی است که با آلسین بلو و تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی می‌شوند. هتروفیل در بافت همبند روده نیز مشاهده شده است. Nakamura و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه روی ماهی تیلایا اظهار داشتند که GALT از سلول‌های لنفوئیدی شامل لوکوسیت‌ها، ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و پلاسماسل‌ها تشکیل شده است. نتایج هیستومتری این بررسی نشان داد که بین پراکنش و تعداد سلول‌های لنفوسیتی در نواحی و بخش‌های مختلف لوله‌ی گوارش اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیش‌ترین تعداد سلول‌های لنفوسیت به ترتیب در بخش خلفی روده‌ی اصلی و حباب روده‌ای مشاهده شد که این امر می‌تواند به دلیل موقعیت خاص آناتومیکی این بخش‌ها باشد، زیرا این نواحی در معرض تماس بیشتری با محیط خارج و در نتیجه آنتی‌ژن‌های خارجی بیش‌تری می‌باشند. بیش‌ترین وظیفه برداشت آنتی‌ژن‌ها بر عهده‌ی قسمت خلفی روده است و

نتایج بافت‌شناسی و هیستومتری تحقیق حاضر نشان داد که در ماهیان نابالغ تراکم سلول‌های لنفوئیدی در بافت پوششی بیش‌تر بوده و زیرمخاط نیز ضخیم‌تر و دارای بافت لنفوئیدی متراکم‌تری می‌باشد که در مقایسه با ماهیان بالغ که بافت پوششی و زیرمخاط دارای بافت لنفوئیدی کم‌تری هستند، بیانگر حضور و فعالیت بیش‌تر بافت لنفوئیدی در ماهی نابالغ می‌باشد.

گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر بلوغ جنسی و تولید مثل به واسطه‌ی فعالیت‌های هورمونی بر پاسخ ایمنی ماهیان وجود دارد. در زمان بلوغ جنسی ماهی به دلیل تغییرات فیزیولوژیک که در سیکل جنسی ماهی اتفاق می‌افتد تعداد سلول لنفوسیتی در گردش خون کاهش یافته ولی بعد از مرحله‌ی تخم‌ریزی، این تعداد افزایش می‌یابد (Schreck 1996, Kaattari and Piganelli 1996, Alcorn et al. 2002, Kortet et al. 2003). گزارش‌های بسیار متنوعی از اثر دما یا تغییرات فصلی روی سیستم ایمنی ماهی وجود دارد اما اکثر محققین بر تأثیر شوک حرارتی روی سیستم ایمنی ماهی بسیار تأکید دارند (Coteur et al. 2004, Rombout 2003, Schreck 1996).

نیکبخت و همکاران در سال ۱۳۸۶ در مطالعه روی ماهی بنی نشان دادند که به طور کلی تعداد سلول‌های لنفوسیتی داخل بافت پوششی و تراکم آن‌ها در فصل سرد بیش‌تر از فصل گرم می‌باشد که این اختلاف بالاخص در بخش خلفی روده‌ی اصلی در هر دو جنس ماهی به طوری واضح معنی‌دار می‌باشد. نتایج مطالعات بافت‌شناسی و میکروسکوپی تحقیق حاضر نشان داد که سلول‌های لنفوسیتی علاوه بر ناحیه‌ی قاعده‌ای سلول‌های روده‌ای تا حدود ۲/۳ بافت پوششی امتداد دارند. Fournier و همکاران در سال ۲۰۰۰ با مطالعه روی ماهی توربوت، وجود سلول‌های لنفوسیت داخل بافت پوششی را فقط در قاعده‌ی سلول‌های روده‌ای و در زیر هسته‌ی آن‌ها گزارش کرده و تأکید نموده‌اند که هیچ سلول لنفوسیتی در ناحیه‌ی

در این ناحیه تراکم سلول‌های لنفونیدی نسبت به سایر نواحی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (Abelli 1997). در سال ۱۹۹۳، Rombout و همکاران در بررسی بافت لنفونیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش ماهی کپور معمولی، تفاوت آشکاری را در پراکنش سلول‌های لنفوسیتی داخل بافت پوششی در طول لوله‌ی گوارش این ماهی مشاهده نکردند. هر چند آن‌ها در مطالعه‌ی مشابهی روی ماهی باربوس کونکونیس که از خانواده‌ی کپور ماهیان است، در پراکنش سلول‌های لوکوسیت داخل بافت پوششی مخاط نواحی مختلف روده‌ی این ماهی تفاوت‌هایی را گزارش کردند و اظهار نمودند که تعداد سلول‌های لوکوسیت داخل بافت پوششی در نواحی قدامی و خلفی لوله‌ی گوارش به طور واضحی بیش‌تر از ناحیه‌ی میانی لوله‌ی گوارش می‌باشد. این محققین تفاوت گونه‌ای، را نیز، یکی از دلایل یکسان نبودن پراکنش سلول‌های لوکوسیت در بافت پوششی روده‌ی دو ماهی فوق‌الذکر بیان نمودند. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که عمل انتقال آنتی‌ژن در روده‌ی خلفی بسیار بالا می‌باشد. Piccheietti در سال ۱۹۹۷، نیز گزارش نموده‌اند که به سمت انتهای روده بر تعداد سلول‌های لنفوسیت داخل بافت پوششی روده‌ی ماهی باس دریایی افزوده می‌گردد.

نتایج به دست آمده از این تحقیق، نشان داد که هر چند ساختار بافت لنفونیدی لوله‌ی گوارش ماهی کپور نقره‌ای همانند دیگر ماهیان می‌باشد لیکن از نظر نواحی استقرار، شکل و پراکنش سلول‌های لنفونیدی دارای اختلافات گونه‌ای قابل توجهی است، به نحوی که بافت لنفونیدی در این ماهی همانند برخی از ماهیان از قبیل کپور علفخوار (آلبوغبیش و همکاران ۱۳۸۳) و قره‌برون (شیبانی و همکاران ۱۳۷۹) که از سه منطقه‌ی داخل بافت پوششی (IEL)، پارین (PL) و پلاک‌های پی‌یر (PP) تشکیل شده است، بافت لنفونیدی پارین بیش‌تر در زیر غشاء بافت پوششی به شکل ساختارهای ستونی شکل و هم‌چنین توده‌های سلولی قرار داشته که این سلول‌ها با عبور از غشای پایه به داخل بافت پوششی نفوذ کرده و

بافت لنفونیدی داخل بافت پوششی را تشکیل می‌دهند. این نفوذ اصولاً در مراحل جنینی و تکامل بافت لنفونیدی صورت می‌گیرد. در این مراحل سلول‌های شبه لنفوسیت و ماکروفاژ در پارین ایجاد و تجمع یافته و سپس به داخل بافت پوششی نفوذ می‌کنند. با شروع تغذیه و هم‌چنین افزایش سن، جمعیت سلول‌های لنفونیدی در پارین و بافت پوششی افزایش می‌یابند که تغییرات به وجود آمده بیانگر این امر است که موقعیت و حضور اولیه‌ی سلول‌های لنفونیدی وابسته به آنتی‌ژن نبوده اما تعداد سلول‌ها در صورت حضور آنتی‌ژن افزایش می‌یابد (Hart et al. 1989). بافت لنفونیدی داخل بافت پوششی به عنوان اولین سد دفاعی در لوله‌ی گوارش ماهی شناخته شده است و نقش مهم آن در ایجاد ایمنی و افزایش تحریک آنتی‌ژن پایدار مورد توجه مطالعات ایمونولوژی شده است (Bozic 1999).

Robert و Donald در سال ۱۹۸۶، در مطالعه روی ماهی طلائی حضور سلول‌های مهاجر لکوسیتی فراوانی مانند سلول‌های لنفوسیت، لنفوبلاست، ماکروفاژ و هتروفیل را در بافت پوششی روده‌ی این ماهی گزارش کردند، اما اکثر محققین فقط به حضور سلول‌های لنفوسیت در بافت پوششی روده تأکید دارند. سلول‌های لنفوسیتی داخل بافت پوششی بیش‌تر از نوع T می‌باشند و معمولاً این سلول‌ها از دو منبع متفاوت شامل تیموس و خود بافت لنفونیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش منشأ می‌گیرند (Matsunaga and Rahman 2001).

نیکبخت و همکاران در سال ۱۳۸۶ در مطالعه‌ی خود روی ماهی بنی، تراکم سلول‌های لنفونیدی در پارین را بیش‌تر از زیرمخاط گزارش نمودند. علاوه بر سلول‌های لنفوسیت، ماکروفاژ، پلاسماسل، ماست سل و سلول‌های دانه‌دار، بر وجود سلول‌های دانه‌دار ائوزینوفیلیک و هم‌چنین سلول‌های PAS مثبتی که احتمالاً سلول‌های واسطه‌ی واکنش ازیاد حساسیت هستند نیز در بافت لنفونیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش ماهیان تأکید شده است (Vallejo and Ellis 1989). در سال ۱۹۹۷، Abelli نیز

این ماهی فاقد تجمعات لنفوئیدی مشخص می‌باشد، اما سلول‌های لکوسیت فراوانی در پارین و زیرمخاط روده مشاهده نمودند (Rombout et al. 1998).

به طور کلی، حضور بسیار متراکم بافت لنفوئیدی به شکل یک ساختار ستونی شکل و یا به شکل توده‌های سلولی و در چند لایه در زیر بافت پوششی و در داخل بافت پوششی تمام لوله‌ی گوارش ماهی کپور نقره‌ای، بیانگر نقش مؤثر و اهمیت محافظتی این بافت در تشخیص و برخورد با آنتی‌ژن‌های پاتوژن بلعیده شده، می‌باشد.

در مطالعه‌ی روی ماهی باس دریایی حضور سلول‌های لنفوسیت بالاخص نوع B و سلول‌های پلاسماسل را گزارش کردند. گرچه اکثر محققین معتقدند که در ماهیان، بافت لنفوئیدی سازمان یافته‌ای مشابه پلاک‌های پی‌یر پستانداران وجود ندارد، اما گزارش‌های اندکی از وجود توده‌های بزرگ لنفاوی و تجمعات فولیکولی به شکل پلاک‌های پی‌یر در سگ ماهی (Matsunaga and Rahman 2001)، قره‌برون (شیبانی ۱۳۷۹) و کپور علفخوار (آبوغیبش ۱۳۸۳)، وجود دارد. در مطالعه‌ای که بر روی ماهی کپور معمولی، انجام شده گزارش شده که

تشکر و قدردانی

از حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز بابت تأمین اعتبار مالی این پژوهش تشکر می‌گردد.

منابع

- nerka). Fish & Shellfish Immunology, 12: 303-334.
- Ardavin, C.F.; Zapata, A.; Garrido, E. and Villena, A. (1982). Ultrastructure of GALT amphibian urodele, *Pleurodeles waltlii*. Cell and Tissue Research, 224: 663-671.
- Bly, J.E. and Clem, L.W. (1992). Temperature and teleost immune functions. Fish & Shellfish Immunology, 2: 159-171.
- Bozic, F. (1999). Isolation of carp (*Cyprinus carpio L.*) intestinal intraepithelial Lymphocytes, Veterinary Arhiv, 69 (2): 97-103.
- Coteur G, Corriere N and Dubois P. (2004). Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*). Fish shellfish Immunology, 16(1):51-63.
- Fournier - Betz, V.; Quentel, C., Lamour, F. and Leven, A. (2000). Immunocytochemical detection of Ig – Positive cells in blood, lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*), Fish & Shellfish Immunology, 10: 187- 202.
- Hart, S.; Wrathmell, A.B.; Harris, J.E. and Gryson, T.H. (1988). Gut immunology in Fish: a review. Developmental and Comparative Immunology, 13 (1): 93-100.
- آبوغیبش نعیم (۱۳۸۳). مطالعه‌ی میکروسکوپی بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی لوله‌ی گوارش (GALT) ماهی کپور علفخوار، دومین همایش بهداشت و بیماری‌های آبزیان ایران، تهران، ۱۳۸۳.
- شیبانی، محمدتقی و پوستی، ایرج (۱۳۷۹). مطالعه‌ی بافت‌شناسی روده‌ها در ماهی قره‌برون. مجله‌ی پژوهش سازندگی، شماره‌ی ۴۹، صفحات ۸۹-۹۱.
- نیکبخت، مرتضی؛ آبوغیبش، نعیم و بیغان، رحیم (۱۳۸۶). مطالعه‌ی هیستولوژی و هیستومتری بافت لنفوئیدی ضمیمه‌ی دستگاه گوارش حباب روده‌ای و روده‌ی اصلی در ماهی بنی. مجله‌ی علوم دانشگاه شهید چمران، شماره‌ی ۱۷، قسمت ب، تابستان ۱۳۸۶.
- Abelli, L.; Picchietti S.; Romano, N.; Mastrolia, L. and Scapigliati, G. (1997). Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of sea bass (*Dicentrarchus Labrax L.*) Fish & Shellfish Immunology, 7: 235-245.
- Alcorn, S.W.; Murra, A.L. and Pascho, R.J. (2002). Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus*

- Kortet, R.; Taskinen, J.; Sinisalo, T. and Jokinen, I. (2003). Breeding-related seasonal changes in immunocompetence, health state and condition of the cyprinid fish, *Rutilus rutilus*, L. Biological Journal of the Linnean Society, 78, 117-127.
- Matsunaga, T. and Rahman, A. (2001). In search of the origin of the thymus: the thymus and GALT may be evolutionarily related. Scandinavian Journal of Immunology, 53: 1-6.
- McMillan, D.N. and Secombes, C.J. (1997). Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. Fish & Shellfish Immunology, 7: 527-541.
- Nakamura, O.; Suzuki, Y. and Aida, K. (2000). Oral immunization specifically inhibits intestinal protein uptake in the common carp (*Cyprinus carpio L.*) Fisheries Science, 66: 540-546.
- Picchei, S.; Terribili, F.R.; Mastrolia, L.; Scapigliati, G. and Abelli, L. (1997). Expression of lymphocyte antigenic developing gut – associated lymphoid tissue the sea bass (*Dicentrarchus Labrax L.*) Anatomical Embryology, 196 (6): 457-463.
- Press, C.M. and Evensen, Ø. (1999) . The morphology of the immune system in teleost fishes. Fish & Shellfish Immunology, Vol 9, pp: 309-318.
- Robert J. Temkin and Donald B. McMillan (1986). Gut –associated lymphoid tissue (GALT) of the goldfish, (*Carassius auratus*), Journal of Morphology, 190 (1): 9-26.
- Rombout, J.H.; Taverne - Thiele, A.J. and Villena, M.I. (1993). The gut- associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio L.*): An immunocytochemical analysis, Developmental and Comparative Immunology, 17: 55-66.
- Rombout, J.H.; Joosten, P.H.; Engelsma, M.Y.; Vos, A.P.; Taverne, N. and Taverne-Thiele, J.J. (1998). Indications for a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp (*Cyprinus carpio L.*). Developmental and comparative Immunology, 22 (1): 63-77.
- Schreck, C. B. 1996. Immunomodulation: endogenous factors. In: G. Iwama and T. Nakanishi (Editors). Hoar and Randall's Fish Physiology, vol. 15. . Pp. 311-337. Academic Press, New York.
- Vallejo, A.W. and Ellis, A.E. (1989). Ultrastructural study of the response of eosinophil granule cells to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Developmental and Comparative Immunology, 13: 133-148.

Histological and micrometric study of gut associated lymphatic tissue (GALT) in mature and immature Silver carp fish

Erfani Majd, N.¹; Payghan, R.² and Yaghobee, Z.³

Received: 12.07.2013

Accepted: 5.11.2013

Abstract

Gut Associated Lymphoid tissue (GALT) is a primary lymphoid tissue in mammals and it is a first defense barrier for pathogen factors. There are many reports about existence of inter and intra species differences in fish GALT structure. In this study 10 Silver fish (5 mature and 5 immature) were selected and 0.5 cm samples were taken from intestine bulb to terminal part of main intestine (colon). The 5-6 μm sections were made using paraffin embedding method. The sections were stained by H&E and PAS. The results showed that the GALT are located in 3 regions and in 2 types. The first, distributed in epithelial tissue, the second location was in lamina propria as columnar or aggregated shapes, and the third location was in submucosa. The lymphoid tissue is consisted mainly from lymphocytes, lymphoblasts, a few plasma cells and macrophages. There is a significant difference in intraepithelial lymphocytes number in mature and immature fish ($P < 0.05$). The maximum lymphocytes were seen in intestinal bulb and main intestine of both mature and immature fish. The results showed that there are significant differences in location, shape and distribution of lymphoid tissue in silver carp fish.

Key words: Histomorphometry, (GALT), Intestinal bulb, Intestine, Silver carp fish

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

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

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

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