مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ۳۲۲-۳۱۳

مطالعه بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی بافت روده قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchusmykiss*) به‌وسیله یک مدل آزمایشگاهی

امین نعمت اللهی .Ph.D[1و2*]، حسین نورانی .Ph.D[3]، هنگامه ملکیان .D.V.M[2]

۱- آزمایشگاه مرجع آبزیان و آرتمیا، گروه تولیدات دامی، دانشکده مهندسی علوم زیستی، دانشگاه گنت، بلژیک
۲- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران
۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: anematolahi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۱

چکیده

هدف: در مطالعه حاضر، مدلی آزمایشگاهی با هدف مطالعه بافت شناسی و ریخت شناسی روده قزل آلای رنگین کمان طراحی شد.

مواد و روش ها: تعداد ۲۰ قطعه ماهی با میانگین وزن ۷۵۰ گرم و میانگین طول ۳۸ سانتی‌متر تهیه شد و با محلول بنزوکائین بی‌هوش گردیدند. چهل دقیقه پس از بی‌هوشی، ماهیان کشته شده و قلب، سرخرگ‌های روده‌ای شکمی و پشتی توسط کالبد شکافی محوطه شکمی در معرض دید قرار گرفت. برای شروع آزمایش یک قسمت جدا شده از روده ماهی تهیه شد و سپس سرخرگ روده‌ای شکمی یا پشتی به‌وسیله یک کاتتر داخل رگی باریک کانال گذاری و بعد روده به‌صورت معلق در یک حمام حاوی محلول رینگر قرار داده شد. مایعات تزریقی گوناگون مانند رینگر، کورتلند، رینگر+ آدرنالین و کورتلند+ آدرنالین مورد آزمایش قرار گرفتند. روده تزریق نشده در محلول رینگر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از انکوبه شدن (۶۰ و ۱۸۰ دقیقه)، نمونه‌های روده از نظر بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی نشان داد که محلول‌های کورتلند و کورتلند+ آدرنالین، پس از گذشت ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه، قادر به حفظ ساختار بافت روده ماهی بوده و تنها ادم خفیف و جدا شدگی ملایمی در اپی‌تلیوم مشاهده شد.

نتیجه گیری: به‌وسیله این روش می‌توان بافت روده را برای مدتی به حالت سالم در خارج از بدن ماهی زنده نگه‌داشت و بدین طریق می‌توان با دقت به مطالعه بافت شناسی و ریخت شناسی اپی‌تلیوم روده در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی پرداخت.

واژگان کلیدی: قزل آلای رنگین کمانOncorhynchus mykiss، بافت روده، کورتلند، مدل آزمایشگاهی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

به‌طور یقین در زیست شناسی حیوانات آبزی، بافت پوششی روده ماهی یکی ازپیچیده‌ترین بافت های بدن جهت حمل ونقل مواد است. این بافت پوششی به گونه‌ای طراحی شده است که به‌طور هم‌زمان انتقال الکترولیت‌ها، اسید و باز، مواد آلی و آب را انجام می‌دهد. روده مکان عمده هضم غذاست و ساختار آن، با توجه به تنوع وسیع عادات غذایی و وظایف آن بسیار گوناگون است. قابل مشاهده‌ترین تفاوت میان ماهیان، طول روده (از اسفنگتر پیلور تا مخرج) است. در بعضی از گونه ها، مشخصا در گونه‌های گوشت خوار طول روده ممکن است تنها حدود ۲۰ درصد طول بدن باشد. در این ماهیان روده مستقیما از معده تا مخرج کشیده شده است. ماهیان بر خلاف سایر مهره‌داران فاقد کولون یا روده بزرگ مشخص هستند و وظایفی را که به‌عنوان مشخصه روده کوچک در نظر گرفته می‌شود مانند هضم و جذب در واقع از اسفنگتر پیلور تا مخرج قابل تشخیص است. جهت افزایش ناحیه سطحی لازم برای هضم و جذب مواد غذایی، تغییرات ساختاری در روده ماهیان مشاهده می‌شود. به‌عنوان مثال در آزاد ماهیان بافت مخاطی روده ضخیم شده و همچنین زوائد پیلوریک یا باب‌المعده‌ای در ابتدای روده واقع شده اند (۱ و ۲).

اگر چه ساختار روده در بین ماهیان بسیار متفاوت است، اما وظایف مربوط به آن‌ها نسبتا در بین گونه‌ها ثابت است. مواد غذایی که وارد روده می شوند با ترشحات حاصل از خود روده و یا سایر اندام ها نظیر کبد، کیسه صفرا و لوزالمعده مخلوط می‌شوند. این ترشحات برای تجزیه مواد غذایی ضروری هستند و شامل آنزیم های گوارشی و سایر اجزایی هستند که فعالیت‌های آنزیم‌ها را با تغییرات در محیط شیمیایی افزایش می دهند. سایر ترشحات اندازه ذرات را کاهش می‌دهند. برای مثال اسیدهای صفراوی حاصل از کیسه صفرا، چربی‌ها را همگن می‌کنند و همچنین نواحی سطحی قابل دسترس برای تاثیر آنزیم‌های لیپاز را بسیار زیاد می‌کنند. فرآیندهای هضم که در مجرای داخلی روده اتفاق می‌افتد، پلی‌مرهای پیچیده موجود در مواد غذایی (برای مثال، پروتئین‌ها، چربی‌ها و مواد قندی) را کاهش می‌دهد و آن‌ها را به اجزای کوچک‌تر تبدیل می‌کند (۱ و ۳). مراحل انتهایی هیدرولیز در سطح غشای سلول‌های روده‌ای (آنترسیت‌ها) یا نزدیک به آن‌ها روی می‌دهد و منجر به آزاد شدن واحدهای ساختمانی پلی‌مرها (برای مثال، مونوساکاریدها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، مونو گلیسریدها) می‌شود که در نتیجه توسط سلول‌های روده‌ای جذب می‌شوند (۱ و ۴ و ۵).

وظایف گوارش شامل سه مورد از جمله تحرک، ترشح و جذب است که نیاز به تنظیم دارد. تنظیم این سه وظیفه دستگاه گوارش توسط فعالیت‌های توام پیام‌های دستگاه عصبی و پیام‌های شیمیایی صورت می‌گیرد. پیام‌های دستگاه عصبی ممکن است از دستگاه عصبی مرکزی منشا گیرد و از طریق دستگاه عصبی مستقل (اتونومیک) اعمال شود اما از دستگاه عصبی روده‌ای مرتبط با دستگاه گوارشی نیز ممکن است صورت گیرد (۱ و ۵).

با توجه با مطالب فوق، مطالعه دستگاه گوارش ماهی و به‌ویژه بافت روده به‌عنوان یکی از پیچیده‌ترین بافت‌های بدن ماهی می‌تواند از نظر بافت شناسی، کالبد شناسی مقایسه‌ای، فیزیولوژی و زیست‌شناسی آبزیان بسیار حائز اهمیت باشد. همچنین مطالعه چگونگی عمل‌کرد بافت روده در هنگام برخورد با عوامل بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا مانند پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها، مواد غذایی و یا مواد سمی و داروهای گوناگون از نظر فرآیند عملی آن بسیار مهم است. از طرف دیگر مطالعه مستقیم بر روی هر موجود زنده و همچنین ماهی دارای مشکلاتی است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: یکی از این موارد تاثیر عوامل ناخواسته داخلی و خارجی در حین انجام آزمایش بر روی بدن ماهی زنده است. مورد دوم وجود قانون حمایت از حیوانات (Animal Welfare)، و البته رعایت آن در هنگام انجام آزمایش است. بدین‌گونه که ماهیان به‌خاطر داشتن گیرنده‌های اپیوئیدی و ساختار مغزی، قدرت درک و احساس درد را داشته و بنابراین مطالعه مستقیم بر روی دستگاه‌های مختلف بدن ماهی دردناک بوده، که این امر بر خلاف قانون حمایت از حیوانات است. مورد دیگر آن است که آزمایش بر روی ماهی زنده نیازمند استفاده از تعداد نسبتا زیاد ماهی است و از آنجا که ماهیان دارای حساسیت و ادراک هستند، کوشش می‌شود که در ابتدا تعداد ماهیان مورد آزمایش را کاهش داده و هم‌چنین در تحقیقات از روش‌های آزمایشگاهی جایگزین (Alternative models) به‌جای ماهی زنده به‌منظور کاهش استرس و درد در این گونه جانوری استفاده نمود (۴، ۵ و۶). بدین منظور، امروزه روش‌ها و مدل‌های آزمایشگاهی دستگاه‌های مختلف بدن جانوران، کاربرد بسیاری در تحقیقات پزشکی، دامپزشکی وعلوم زیستی پیدا کرده است. به‌وسیله این روش‌های آزمایشگاهی می‌توان اندام‌ها، بافت‌ها و یا قسمتی از اندام‌های مختلف بدن موجودات گوناگون را در بیرون بدن حیوان در آزمایشگاه، زنده نگه‌داشت و آزمایش‌های مختلفی را بدون

Archive of SID
www.SID.ir

ایجاد ناراحتی در حیوان با رعایت حقوق حیوانات بر روی آن‌ها انجام داد (۶ و ۷ و ۸).

تاکنون، مدل‌های مختلف تزریق بـه روده (perfusion models) مانند مدل باز(open)، نیمه باز (semi-open)، بسـته (closed)، تزریق به یک قسمت روده گره‌خورده (tied loop) درطول عمـل جراحی و همچنین تزریق کولورکتـال (colorectal perfusion) مورد استفاده محققیق قرار گرفتـه انـد. بـا ایـن حـال مشـکلات متعددی در حین استفاده از این روش‌های تزریقـی ماننـد نشـت محلول تزریقی، بروز ادم و از دست دادن موکوس و بافت مخاطی ممکن است ایجـاد شـود. ضـمنا در اکثـر ایـن روش‌هـا بررسـی بافت‌شناسی بافت روده متعاقب تزریق که می‌توانـد یـک شناسـه بسیار خوب برای مطالعه خصوصیات طبیعی و بقا سـلولی بافـت روده باشد، نادیده گرفته شده است (۹و۱۰ و۱۱و ۱۲و۱۳و۱۴). با توجه به موارد فـوق، در مطالعـه حاضـر، مـدلی آزمایشـگاهی بـا هدف، مطالعه بافت شناسی و ریخت شناسی *بافت اپی‌تلیوم روده* ماهی قزل آلای رنگین کمان *در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی* طراحی شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزن ۷۵۰ گرم و میانگین طول ۳۸ سانتی‌متر تهیه شد. ماهی‌ها در تانک‌های جداگانه با ظرفیت تقریبا۱۰۰۰ لیتر که دارای سیستم جریان آب (۱۴ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد) هوا دهی شده نیز بود، به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش، نگهداری شدند. ماهی‌ها تا مدت دو روز قبل از شروع آزمایش، روزانه به‌وسیله خوراک تجاری تغذیه می‌شدند. برای اطمینان از سلامت ماهیان، از پوست، باله و آبشش آن‌ها گسترش مرطوب تهیه گردید و هیچ‌گونه آلودگی انگلی مشاهده نشد. برای بی‌هوش کردن ماهیان از محلول بنزوکائین (اتیل آمینو بنزوات) در اتانول (۰/۱ گرم در ۱ میلی‌لیتر) استفاده شد. ماهیان به‌طور متوسط ظرف مدت ۴ تا ۵ دقیقه بی‌هوش شدند. سپس به‌صورت داخل صفاقی در فاصله بین باله سینه‌ای و باله شکمی با زاویه ۴۵ درجه، (IU/kg) ۵۰۰۰ هپارین به آن‌ها تزریق شد. در ادامه ماهیان را در آب تازه و هوادهی شده قرار داده تا به‌هوش آمدند. ماهیان به‌طور متوسط ظرف مدت ۵ دقیقه به‌هوش آمده و به‌مدت ۴۰ دقیقه رها شدند تا هپارین وارد دستگاه گردش خون شده و در بدن ماهی پخش شود. سپس ماهی‌ها با استفاده از دوز بالای محلول بنزوکائین کشته و به میز جراحی انتقال داده شدند.

با هدف خارج کردن روده‌ها، محوطه بطنی را از سطح جانبی باز کرده و در عین حال به این نکته باید توجه کرد که به روده آسیب نرسد. سپس با دقت روده را به‌منظور پیدا کردن عروق خونی از محوطه بطنی بیرون کشیده و دو سرخرگ روده‌ای پشتی و شکمی بعد از زوائد باب المعدی نمایان شدند. سپس سرخرگ پشتی یا شکمی هر قطعه روده را با لوله پلی اتلین بلندی (۲۰ سانتی‌متر) که در انتهای آن سر سوزنی (۱/۵ سانتی‌متر) با درجه ۲۲ قرار داده شده بود، کانال گذاری کرده به‌گونه ای که در حدود ۰/۳ تا ۰/۴ سانتی‌متر از طول سر سوزن در داخل سرخرگ قرار گیرد و سپس با نخ ابریشم ۲/۰ روده محکم گره زده شد تا سر سوزن خارج نشود. قطعات روده متعاقبا برای تزریق محلول‌های جایگزین شونده خون مورد استفاده واقع شدند. مایعات تزریقی گوناگون مانند رینگر، کورتلند، رینگر+ آدرنالین (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) و کورتلند+ آدرنالین (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول ۱).

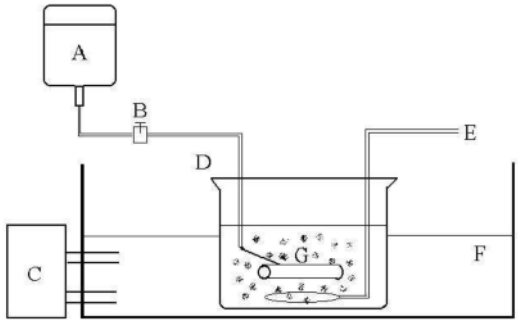
محلول نمکی کورتلند، محلولی است که برای بافت های ماهیـان آب شیرین طراحی شده و مورد استفاده قرار می گیـرد (۶ و۱۹). قطعه‌ای از روده به‌عنوان قطعه‌ای که در آن هـیچ مـایعی تزریـق نشد در محلول رینگـر در دمـای ۱۴ تـا ۱۶ درجـه سـانتی‌گـراد به‌عنوان کنترل منفی قرار داده شد. هر قطعه روده به‌صورت مجزا داخـل حمـامی کـه هـوا دهـی مـی‌شـد، بـه‌صـورت معلـق

جدول۱: ترکیبات محلول های رینگر و کورتلند مورد استفاده در مطالعه حاضر

	Cortland (g/L)	Ringer (g/L)
Nacl	۷/۲۵	۸/۵۰
KCl	۰/۳۸	۰/۲۰
Na_2HPO_4	۰/۴۱	-
$MgSO_4$	۰/۲۴	-
$CaCl_2$	۰/۱۶	۰/۲۰
$NaHCO_3$	۱/۰۰	۰/۰۱
Glucose	۱/۰۰	-

Archive of SID
www.SID.ir

قرار گرفته شد. این حمام شامل محفظه‌ای بود که با محلول رینگر پرشده و به‌وسیله محفظه آبی (آکواریوم) با درجه حرارت ۱۴ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد احاطه می‌شد. سپس از یک ست سرم که تقریبا در ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر بالای حمام واقع شده بود، استفاده شد تا مایع جایگزین مورد نظر از طریق سرخرگ به قطعه روده تزریق شود (شکل ۱).



شکل ۱: نمای طرح کلی مدل آزمایشگاهی تزریق به روده ماهی A: کیسه مایع تزریقی، B: پیچ کنترل، C: سیستم سرد کننده، D: حمام رینگر، E: هواده، F: آکواریوم، G: قطعه روده ماهی

همان طور که قبلا بیان شد، در این مطالعه از چهار محلول جایگزین شونده خون برای زنده ماندن بافت روده ماهی در حالت آزمایشگاهی (*in vitro*) استفاده گردید و هر آزمایش ۳ بار تکرار شد.

زمان برای هر آزمایش ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه در نظر گرفته شد. پس از اتمام هر آزمایش برای بررسی وضعیت ریخت شناسی و بافت شناسی روده‌ها، از قطعات روده که در آن مایع جایگزین شونده تزریق شده بود و همچنین نمونه‌های کنترل (کنترل مثبت، کنترل منفی)، نمونه‌های بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تهیه شد. جهت تهیه نمونه‌های بافت شناسی، یک قطعه کوچک از روده قطع شده و داخل بافر فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس بعد از آماده سازی بافت از آن‌ها برش‌هایی به عرض ۵ میکرومتر تهیه و با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌های تهیه شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی بافت شناختی قرار گرفتند.

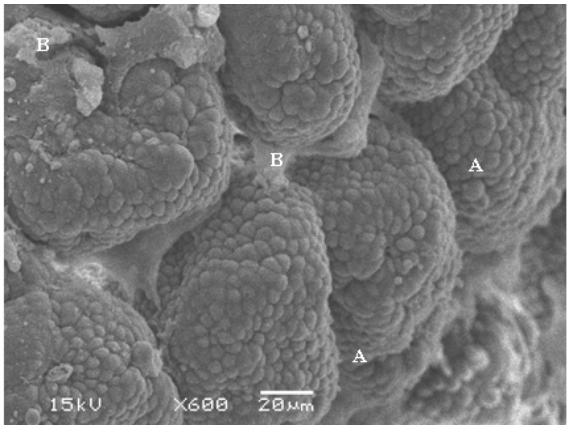
برای تهیه نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، نمونه‌ها تا حد ۵ میلی‌متر برش داده شدند زیرا محلول‌های تثبیت کننده و خشک کننده به‌سرعت قادر به نفوذ در نمونه‌های ضخیم‌تر نیستند. سپس نمونه‌ها در هیدروکسیل اتیل پیپرازین اتان سولفونیک اسید (HEPES) بافر (pH ۷/۳ , ۰/۱ مولار) حاوی ۲/۵ درصد گلوتارآلدهاید (glutaraldehyde) و ۲ درصد پارافورمالدهاید (paraformaldehyde) قرار داده شدند و در آب مقطر حاوی ۱ درصد اسمیم تتراکسید(osmium tetroxide) ثابت شد. بعد آب نمونه‌ها به‌وسیله الکل و استون گرفته شده و توسط دی اکسید کربن مایع مواد خشک کننده به‌طور کامل از نمونه‌ها جدا شدند. سپس نمونه‌ها با لایه‌ای از کربن و آلومینیوم آغشته شده و با لایه‌ای از پلاتین اندود شدند. بعد هر نمونه در یک قاب استوار قرار داده شده و سپس به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (JEOL, Tokyo, Japan) مورد مطالعه قرارگرفتند.

نتایج

مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی، قابلیت زنده نگه‌داشتن بافت روده در بیرون بدن ماهی، با استفاده از محلول‌های جایگزین شونده خون و مقایسه این محلول‌ها، در دو فاصله زمانی ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه به‌طور مختصر در جدول ۲ نشان داده شده است. قطعاتی از روده که بلافاصله پس از کشتن ماهی، برش خورده و داخل بافر فرمالین قرار گرفتند (کنترل مثبت)، دارای اپی‌تلیوم سالم به‌همراه سلول‌های جامی (Goblet cells) کاملا مشخص و حاشیه مسواکی سالم و دست نخورده (Intact brush border) بودند (شکل ۲و ۳).

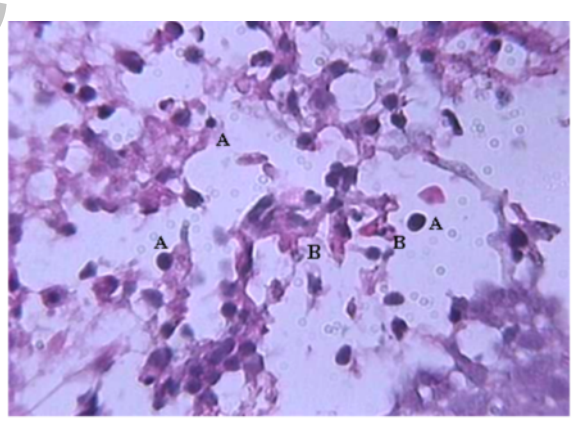
شکل۲: بافت طبیعی روده (کنترل مثبت)، که در آن اپی‌تلیوم سالم (A)، سلول‌های جامی (Goblet cells) (B) و حاشیه مسواکی سالم و دست نخورده (C) مشخص شده اند. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. بزرگنمایی × ۱۶۰.

www.SID.ir



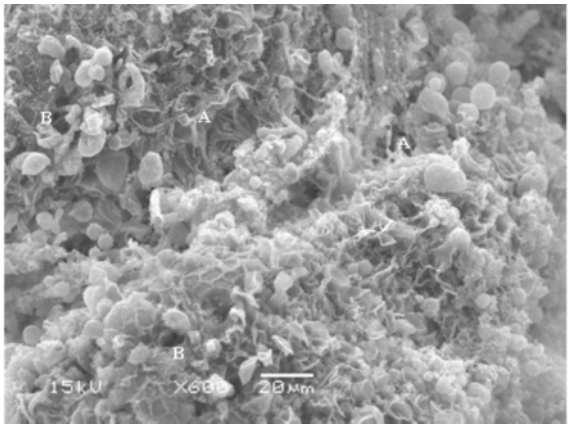
شکل۳: بافت طبیعی روده (کنترل مثبت)، که در آن اپی‌تلیوم سالم و دست نخورده (A) و موکوس(B) مشخص شده‌اند و ساختار کلی بافت روده سالم و بدون صدمه است (۲۰µm = مقیاس)

در قطعات روده تزریق نشده، که بعد از ۶۰ دقیقه در داخل بافر فرمالین ۱۰درصد قرار گرفتند (کنترل منفی)، دژنراسیون شدید، جدا شدگی شدید در اپی‌تلیوم روده و نهایتا نکروز بافتی مشاهده گردید. در بعضی نمونه‌ها حالت پیکنوز و کاریورکسی متعاقب نکروز بافتی نیز دیده شد (شکل ۴). همچنین در این نمونه‌ها بعد از ۱۸۰ دقیقه، تقریبا به‌طور کامل ساختار بافت روده از بین رفته بود و نکروز به‌طور وسیع مشاهده گردید (جدول ۲).



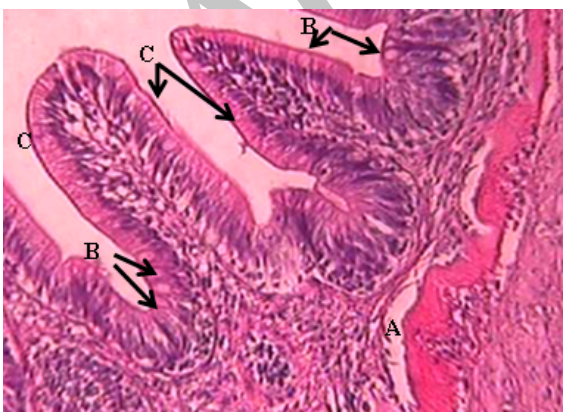
شکل۴: بافت روده تزریق نشده بعد از ۶۰ دقیقه (کنترل منفی)، دژنراسیون شدید، جدا شدگی شدید در اپی‌تلیوم روده و در نهایت پیکنوز(A) و کاریورکسی (B) متعاقب نکروز بافتی. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. بزرگنمایی × ۱۰۰۰.

قطعات روده که محلول رینگر به مدت ۶۰ دقیقه در آن تزریق شده بود، شباهت زیادی با نمونه‌های مربوط به قطعه‌های روده که هیچ‌گونه تزریقی در آن‌ها نشده بود (کنترل منفی) داشتند. در این نمونه‌ها ادم، نکروز و از دست رفتن ساختار روده دیده شد و بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه، ضایعات بسیار شدید شده و ساختار روده به‌طور کامل از بین رفته بود (شکل۵ و جدول ۲).



شکل ۵: بافت روده تزریق شده با رینگر پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه. در این نمونه‌های بافتی، ضایعات شدید در اپی‌تلیوم (A)، نکروز وسیع (B) و از دست رفتن ساختار روده دیده شد (۲۰µm = مقیاس).

قطعات روده که محلول رینگر+ آدرنالین به‌مدت ۶۰ دقیقه در آن تزریق شده بود، شباهت زیادی با نمونه‌های مربوط به قطعه‌های روده که فقط محلول رینگر در آن‌ها تزریق شده بود، داشتند. در این نمونه‌ها، ضایعات شدیدی شامل ادم، دژنراسیون و نکروز مشاهده گردید و بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه از تزریق محلول رینگر + آدرنالین به بافت روده، ضایعات بافتی شامل دژنراسیون و نکروز تشدید گردید و ساختار روده کاملا از بین رفته بود (جدول ۲). در بافت روده که محلول کورتلند به مدت ۶۰ دقیقه در آن تزریق شده بود، ادم ملایم و جدا شدگی خفیف در اپی‌تلیوم روده دیده شد و سلول‌های جامی و حاشیه مسواکی سالم و دست نخورده به‌خوبی دیده شد. پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه تزریق محلول کورتلند، ادم و جدا شدگی خفیف در اپیتلوم روده دیده شد و در نهایت ساختار روده به خوبی حفظ شده بود (شکل۶ و جدول ۲).

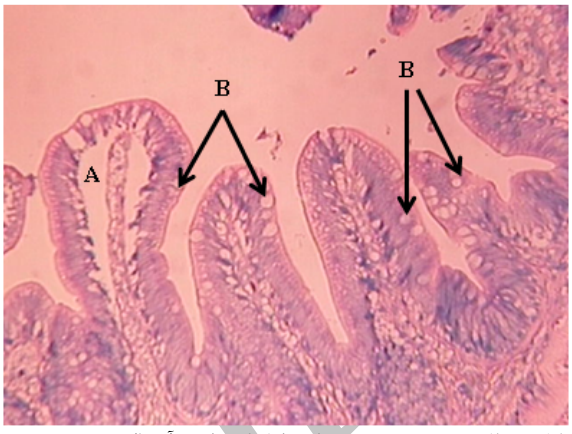


شکل ۶: بافت روده تزریق شده با محلول کورتلند به مدت ۱۸۰ دقیقه. در این نمونه‌های بافتی، ادم و جدا شدگی خفیف در اپی‌تلیوم روده دیده شد (A) و سلول های جامی (B) و حاشیه مسواکی سالم و دست نخورده (C) به‌خوبی مشخص بود. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. بزرگنمایی × ۱۶۰.

Archive of SID

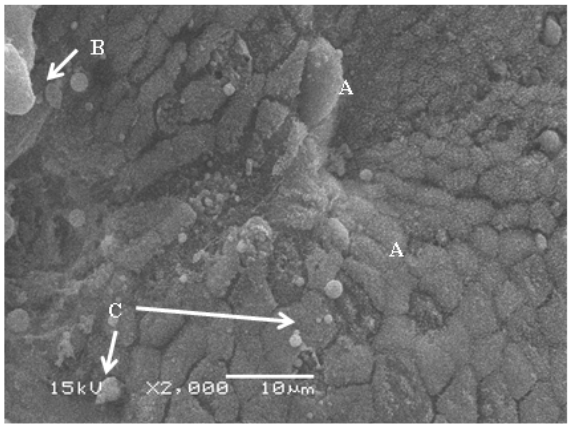
www.SID.ir

در بافت‌های روده که کورتلند + آدرنالین به مدت ۶۰ دقیقه در آن تزریق شده بود، ادم مشاهده شد ولی ساختار طبیعی روده به خوبی حفظ شده بود (شکل ۷).



شکل ۷: بافت روده تزریق شده با محلول کورتلند+ آدرنالین به‌مدت ۶۰ دقیقه. در این نمونه‌های بافتی، ادم ، جدا شدگی در اپی‌تلیوم روده (A) و سلول‌های جامی (B) دیده شد و ساختار طبیعی روده به‌خوبی حفظ شد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. بزرگنمایی × ۱۶۰.

پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه از تزریق کورتلند + آدرنالین به‌داخل بافت روده، همچنان ساختار روده حالت طبیعی خود را حفظ کرده بود و ادم خفیفی به همراه اندکی جدا شدگی و همچنین تعداد بسیار کمی سلول نکروزه در آن‌ها دیده می‌شد (شکل ۸ و جدول ۲).



شکل۸: بافت روده تزریق شده با محلول کورتلند+ آدرنالین به‌مدت ۱۸۰ دقیقه. در این نمونه‌های بافتی اپی‌تلیوم سالم و دست نخورده روده (A) و موکوس(B) مشخص شده‌اند و فقط تعداد کمی سلول نکروزه دیده شد (C) (۱۰µm = مقیاس)

جدول ۲: نتایج بدست آمده از مطالعه قابلیت زنده نگه‌داشتن نمونه‌های روده در بین چهار محلول جایگزین شونده خون در دو فاصله زمانی ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه

قطعات روده تزریق شده و تزریق نشده	تعداد نمو نه‌های بافتی	طول زمان تزریق	ادم	جدا شدگی	نکروز	ساختارروده
با فت طبیعی روده	۱۲	۰	-	-	-	طبیعی
محلول کورتلند	۱۲	۶۰	خفیف	خفیف	-	نسبتاً طبیعی
محلول رینگر	۱۲	۶۰	شدید	شدید	شدید	غیر طبیعی
محلول کورتلند+ آدرنالین	۱۲	۶۰	خفیف	خفیف	-	نسبتاً طبیعی
محلول رینگر+ آدرنالین	۱۲	۶۰	شدید	شدید	شدید	غیر طبیعی
قطعه روده تزریق نشده	۱۲	۶۰	شدید	شدید	شدید	غیر طبیعی
محلول کورتلند	۱۲	۱۸۰	خفیف	خفیف	_	نسبتاً طبیعی
محلول رینگر	۱۲	۱۸۰	شدید	شدید	شدید	غیر طبیعی
محلول کورتلند+ آدرنالین	۱۲	۱۸۰	خفیف	خفیف	_	نسبتاً طبیعی
محلول رینگر+ آدرنالین	۱۲	۱۸۰	شدید	شدید	شدید	غیر طبیعی
قطعه روده تزریق نشده	۱۲	۱۸۰	شدید	شدید	شدید	غیر طبیعی

بحث

امروزه انواع گوناگون ماهی، به‌عنوان حیوانات آزمایشگاهی توسط پژوهشگران در تحقیقات مختلف زیست شناسی، ژنتیک، فیزیولوژی، پزشکی و دامپزشکی آبزیان استفاده می‌شوند. تاکنون محققین متعددی سعی نمودند که با استفاده از محلول‌های گوناگون جانشین شونده خون، با روش های آزمایشگاهی مدلی مناسب را برای مطالعه بافت های مختلف ماهیان در شرایط آزمایشگاهی و قابل کنترل ارائه دهند (۶ و۷و۱۰ و۱۲و۱۳و۱۴و۱۵).

خون در مقایسه با محلول‌های نمکی، ویژگی‌های مهم‌تری داشته و قابلیت انتقال اکسیژن بیشتری دارد، ولی استفاده از خون دراین گونه مدل‌های آزمایشگاهی مشکلاتی را به همراه دارد. اولا

Archive of SID
www.SID.ir

خون‌گیری در مقادیر زیاد، کاری بسیار سخت و دشوار می باشد. دوما، ویسکوزیته بالای خون ماهی، باعث بسته شدن کانال‌های تزریق شده و جلوگیری از ادامه جریان خون و تزریق آن می کند و سوما، خون مایعی گران می‌باشد، در صورتی که از ویژگی محلول‌های جایگزین شونده، ارزان بودن و سادگی تهیه آن‌ها است (۱۱). همچنین پژوهشگران متعددی نیز درجستجوی یافتن مدل‌های آزمایشگاهی جایگزین برای اندام‌های مختلف داخلی ازجمله روده، کبد، ریه، کلیه و مغز بوده تا بتوانند بافت و اندام‌های مورد نظر را برای مدت زمان کافی در شرایط آزمایشگاهی زنده نگه‌داشته وبرای مطالعه فرآیندهای فیزیولوژیکی، سم شناسی و داروشناسی مورد استفاده قرار دهند. ضمنا، کاربردی بودن روش‌های گوناگون تزریق به روده در مطالعات زیست شناسی، داروشناسی و سم شناسی به اثبات رسیده و در این روش‌ها محققیق قادر به نگه‌داری و حفظ سلامتی بافت روده تا پایان مطالعات خود بوده‌اند (۱۱و۱۲و۱۶ و۱۷و۱۸و۱۹و۲۰و۲۱). در واقع سودمندی این روش‌های جایگزین آزمایشگاهی در به‌دست آوردن اطلاعات دارویی کامل و منظم با توجه به چگونگی روند جذب دارو و سوخت و ساز آن در بدن و عوامل موثر بر این فرآیندها به اثبات رسیده است (۱۱و۱۴).

از طرف دیگر، از این مدل‌های جایگزین آزمایشگاهی جهت بررسی بیماری‌های عفونی نیز استفاده شده است. Decostere و همکاران (۶) یک مدل جایگزین آزمایشگاهی برای مطالعه اثر عوامل بیماری زای ماهی بر روی بافت آبشش کپور معمولی را ابداع نمودند. در این مطالعه از محلول‌های گوناگون فیزیولوژیک که به‌نظر می‌آمد، قابلیت زنده نگه داشتن بافت آبشش ماهی را دارا بودند، به جای خون استفاده شد. سپس در تحقیق دیگری از این مدل برای مطالعه چگونگی فرآیند برخورد باکتری فلاوباکتریوم کولومناره با بافت آبشش و همچنین عوامل محیطی موثر در بروز این بیماری استفاده نمودند (۲۲). Nematollahi و همکاران (۱۵) از مدل جایگزین آبشش برای مطالعه واکنش بین باکتری فلاوباکتریوم سایکروفیلوم با آبشش قزل آلای رنگین کمان استفاده نمودند و در این تحقیق مراحل اولیه واکنش بین باکتری و بافت آبشش ماهی به‌روش داخل آزمایشگاهی ارزیابی شد.

اولین مشکل در مطالعه حاضر چگونگی انجام مراحل کانال‌گذاری در رگ‌های روده ماهی بود. به‌طور کلی، کالبد شکافی رگ‌های خونی ماهی قزل آلای رنگین کمان مرده سخت بوده و تشخیص رگ‌های خونی در بافت‌های مرده به‌علت وجود چربی و زوائد باب المعدی (pyloric caeca) متعدد بسیار مشکل است. بدین منظور از انجام تکنیک کانال‌گذاری بر روی چهار عدد از بزرگترین ماهیان مورد مطالعه (۱۰۰۰ گرمی)، تجربه کافی برای انجام این تکنیک بر روی سایر ماهی‌ها به‌دست آمد. مسئله مهم بعدی چگونگی و سرعت تزریق بود. Perry و همکاران (۱۹) در مطالعه‌ای در مورد روش‌های گوناگون تزریق به آبشش ماهی، سرعت تزریق ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به‌ازای هر کیلوگرم پیشنهاد نمودند. ولی در تحقیقات قبلی بیان شده بود که قدرت زیست اندام‌های تحت تزریق به‌سرعت تزریق مورد استفاده بستگی ندارد. به‌همین دلیل، چکاندن و یا تزریق به‌روش قطره‌ای، یک روش مناسب خواهد بود. Decostere و همکاران (۷) نیز از همین روش تزریقی در مطالعات خود استفاده نمودند.

در مطالعه حاضر، نمونه‌های روده که پس از مرگ ماهی فورا تثبیت شده بود (کنترل مثبت)، دارای بافت و اپی‌تلیومی سالم به‌همراه سلول‌های جامی و سایر سلول‌های مخاطی روده بودند (شکل۲و۳). مقایسه اولیه‌ای بین قطعات روده‌ای تزریق شده به‌وسیله محلول کورتلند و یا محلول رینگر انجام گرفت. در بافت روده‌ای که به‌مدت ۶۰ دقیقه با محلول رینگر، مورد تزریق قرار گرفته بود، ادم، نکروز و از دست رفتن ساختار روده دیده شد و بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه تزریق رینگر، ضایعات بسیار شدید شده و ساختار روده به‌طور کامل از بین رفته بود. در حالی که سلول‌های مخاطی و زیر مخاطی اپی‌تلیوم روده تزریق شده با محلول کورتلند به مدت ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه، در شرایط ساختاری بهتری نسبت به تزریق با محلول رینگر قرار داشتند. آزمایشات بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی مربوط به قطعات روده‌ای که مورد تزریق محلول کورتلند (زمان تزریق ۶۰ دقیقه ای) قرار گرفته بودند، هیچ‌گونه انحطاط بافتی و نکروز را نشان نداد و نیز پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه تزریق محلول کورتلند ، ادم و جداشدگی خفیف در اپی‌تلیوم روده و نکروز بسیار خفیف دیده شد (شکل۶). در واقع روند انحطاط و از بین رفتن بافت روده، از ایجاد حالت پوسته پوسته و تولید یک دسته سلول مخاطی در اپی‌تلیوم روده تا ایجاد حالت نکروز و مرگ کامل بافت متغیر است. به‌عبارت دیگر، ساختار بافت روده در هنگام تزریق محلول کورتلند بهتر حفظ شده بود و میزان انحطاط سلولی به‌طور معنی داری کمتر دیده شد. در حقیقت، محلول تزریقی رینگر از پیشروی ادم و نیز از دست رفتن ساختار کلی بافت روده، نتوانست جلوگیری کند. در این بررسی، درجه پیشروی ادم از

Archive of SID

www.SID.ir

طریق تخمین یا برآورد میزان وسعت فضاهای بین نواحی مخاطی ارزیابی شد (شکل ۴و ۵ و جدول ۲). در این آزمایش، به منظور جلوگیری از پیشروی ادم، آدرنالین به محلول‌های رینگر و کورتلند اضافه شد. اما محلول اضافه شده اثر مثبت بسیار کمی داشت. به‌علاوه، غنی سازی کورتلند، با آدرنالین در جلوگیری از پیشروی ادم تا حدودی زیادی موثر واقع شد ولی در خصوص محلول رینگر و آدرنالین این ترکیب نیز نتوانست از پیشروی ادم، نکروز و از دست رفتن ساختار کلی بافت روده جلوگیری کند (جدول ۲).

مقاومت رگی ماهی‌ها به آسانی تحت تاثر شرایط فیزیولوژیکی قرار می‌گیرد و در نتیجه باعث تفاوت در جریان تزریق خواهد شد. در این مطالعه، محلول‌های مورد تزریق توسط یک صافی، پالایش شده بودند تا اجزا میکروسکوپی درون این محلول‌ها حذف گردد. Rankinو Maetz (۲۳) بیان کردند که استفاده از یک محلول نمکی فیلتر نشده باعث می‌شود که جریان تزریق ماده جانشین شونده به‌خوبی انجام نشود. به‌عبارت دیگر این محلول نمکی نمی‌تواند به‌راحتی در عروق و بافت جریان یابد، بنابراین، آن‌ها استفاده از یک میکرو فیلتر را جهت پالایش محلول فوق پیشنهاد نمودند. از طرف دیگر Smith (۲۴)، بیان نمود که نیازی به استفاده از محلول‌های فیلتر شده در این گونه موارد نیست. ولی به نظر می‌رسد که استفاده از فیلتر در مطالعه حاضر سودمند بود. این موضوع توسط Decostere و همکاران (۷) که به‌نتایج خوبی با استفاده از فیلتر (صافی) قهوه رسیده بودند، نیز اثبات شده است. محلول‌های نمکی مختلف برای تزریق روده ای در ماهی‌ها قابل استفاده اند و تفاوت‌های شیمیایی میان این محلول‌های تزریقی از اهمیت کمی برخوردار است ولی به‌طور کلی برخی از عناصر شیمیایی موجود در این محلول‌ها باید بیشتر مورد توجه قرار گیرند (۶ و ۷و ۲۳). غلظت نسبتا کم کلسیم برای جلوگیری از گرفتگی رگ‌ها و نیز pH محلول مورد تزریق بسیار مهم می باشند. pH بین ۷/۶ تا ۸/۱ ظاهرا ایده آل بوده و این pH ممکن است با استفاده از سدیم بی‌کربنات یا سدیم فسفات (که به عنوان بافر عمل می‌کنند) تنظیم شود. در این مطالعه، محلول کورتلند بهتر از رینگر در حفظ قدرت زیست بافت روده ای موثر بود. قبل از این، مقادیر زیادی از سدیم بی کربنات و سدیم فسفات به محلول اضافه می‌شد، اما در محلول های اخیر از خاصیت بافری کمتری استفاده می‌نمایند. اگر فشار اسمزی کلوئیدی محلول مورد تزریق کمتر از فشار بافت روده باشد، ممکن است ادم افزایش یابد (۶ و ۷و ۲۳). Shuttleworth (۲۵) بیان نموده که آدرنالین می‌تواند مقاومت رگ‌های خونی را از طریق گشاد سازی رگ‌ها و افزایش سیالی‌شدن محلول تزریقی کاهش دهد. به‌عبارتی دیگر، آزمایشات قبلی حتی بیان کرده‌اند که درجه بالای ادم با استفاده از آدرنالین می‌تواند ایجاد شود.

آزمایشات بافت شناسی مربوط به قطعات روده‌ای که مورد تزریق نبوده‌اند بیانگر تجزیه و نکروز رو به توسعه بافتی بود. این انحطاط یا تجزیه، از ایجاد حالت پوسته پوسته (ناشی از انبوه سازی و تجمع سلول های دیوارۀ مخاطی) تا ایجاد حالت نکروز و از بین رفتن کامل ساختار سلول‌ها می‌تواند روی دهد. همان طور که قبلا ذکر شده، در بافت‌های روده‌ای که سریعا پس از مرگ ماهی تثبیت شده‌اند (کنترل مثبت)، سلول‌های جامی و بعضی درجات جدا شدگی در اپی‌تلیوم بافت‌های روده‌ای قابل توجه است. این فرآیند، قضاوت در مورد چگونگی بقا و زنده ماندن هر یک از مقاطع بافتی تزریق شده توسط مایعات گوناگون جانشین شونده خون را مشکل خواهد ساخت.

مدل تزریق روده‌ای، مدلی ساده و موثر است که به‌وسیله آن، می‌توان، اولا به مطالعه بافت شناسی روده در خارج از بدن ماهی پرداخت و دوما مراحل اولیه برخورد عوامل بیماری زا (باکتری، ویروس، انگل) را بر روی بافت روده مورد بررسی قرار داد. از طرف دیگر استفاده از این گونه مدل‌های آزمایشگاهی، در مطالعات گوناگونی نظیر فارماکولوژی، سم شناسی، آسیب‌شناسی، فیزیولوژی مناسب به نظر می رسد. همچنین با استفاده از این روش‌ها می‌توان خواص زیان آور عوامل شیمیایی و محیطی مانند سموم گوناگون در آب (نیترات، نیتریت، آمونیاک، H2S) را مورد بررسی قرار داد و اثرات آن ها را بر روی بافت‌های بدن ماهی بررسی نمود (۱۰ و۱۲و۱۳و۱۴و۱۵و ۲۱و ۲۲و ۲۶ و۲۷و ۲۸).

علاوه بر مزایای اشاره شده، مدل آزمایشگاهی تزریق روده‌ای می‌تواند به‌عنوان یک روش جایگزین با ارزش به‌جای استفاده از ماهی زنده در تحقیقات گوناگون مورد استفاده قرار گیرد. این مدل به شکل موفقیت آمیزی سه ویژگی مورد نظر Russell و Burch(۲۶) که عبارت از جایگزینی (Replacement) ، کاهش تعداد حیوانات (Reduction) و تسکین درد (Refinement) است را دارا بوده که جنبه‌های اساسی اصول رعایت حقوق حیوانات در مطالعات انجام شده بر روی آن‌ها است (۲۶و ۲۷).

www.SID.ir
Archive of SID

در مدل آزمایشگاهی فوق، از هر ماهی می‌توان ۲ الی ۳ قطعه روده تهیه نمود ودر نتیجه از تعداد ماهیان مورد آزمایش کاسته می‌شود. علاوه بر این ماهیان، بلافاصله قبل از خروج روده از محوطه بطنی کشته می شوند (Euthanasia) و در نتیجه در معرض عفونت‌های احتمالی نیستند. این موضوع، به‌طور مشخصی میزان درد و استرس ماهی را کاهش می‌دهد و مدل تزریق روده‌ای را روش مناسبی از جهت عدم تحمل درد توسط حیوان می‌سازد.

از بین محلول‌های جایگزین به‌کار برده شده در بررسی حاضر، محلول رینگر نتوانست از بافت روده محافظت کند و ساختمان اصلی بافت روده به‌طور کامل از بین رفت، در حالی که محلول کورتلند توانست ساختمان اصلی روده را در زمان های تزریقی ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه تا حدود زیادی حفظ نماید که بسیار شبیه حالت طبیعی بافتِ روده (کنترل مثبت) بود (جدول۲). تفاوت بین محلول رینگر و محلول کورتلند وجود مقدار بالای فسفات سدیم و بی‌کربنات سدیم در محلول کورتلند می‌باشد. این دو ترکیب در pH نهایی مایع تزریقی دخیل است. ضمنا pH نهایی بر روی قابلیت سالم نگه داشتن بافتِ روده مؤثر است. لازم به ذکر است که میزان فشار اسمزی مایع تزریقی به بافت روده نیز مهم به‌نظر می‌آید. زمانی که فشار اسمزی مایع تزریقی از فشار اسمزی بافت کمتر باشد، ادم رخ می‌دهد. البته قابلیت نفوذ پذیری سلول‌های پایه در این میان دخالت دارند. در نتیجه به‌نظر می‌آید که محلول کورتلند، محلول جایگزین مناسب‌تری از نظر فشار اسمزی در مقایسه با محلول رینگر می‌باشد.

تجمع مایع در بافت بینابینی باعث ضخیم شدن سد آبی- خونی می‌شود، در نتیجه انتقال اکسیژن از آب به خون، کاهش می یابد (۴و ۵و ۱۲). محلول رینگر+ آدرنالین ضایعات شدیدی در بافت روده ایجاد نمود و بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه ساختار بافت روده ماهی کاملا از بین رفت. در مقابل، محلول کورتلند+ آدرنالین ضایعات خفیفی در بافت روده ایجاد نمود و ساختار روده به‌خوبی حفظ شده بود (جدول۲).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر محلول‌های کورتلند و کورتلند+ آدرنالین محلول‌های جایگزین شونده مناسبی بودند. نتایج بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی نشان داد که محلول‌های کورتلند و کورتلند+ آدرنالین، پس از گذشت ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه، قادر به حفظ ساختار بافت روده ماهی بوده و تنها ادم خفیف و جدا شدگی ملایمی در اپی‌تلیال بافت روده مشاهده شد. همچنین به‌وسیله این روش می‌توان بافت روده ماهی را برای مدتی به حالت سالم در خارج از بدن ماهی زنده نگه داشت و با دقت به مطالعات گوناگون زیست شناسی، داروشناسی، دامپزشکی و غیره در بافت اپی‌تلیال روده این گونه جانوری آبزی در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی پرداخت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند تا ازکمک‌های ارزشمند آقایان یدا... خسروی، نادر احمدی، آیت ا... حاتم پور دراین پژوهش تشکر و سپاسگزاری نمایند. بدین‌وسیله ازتحصیلات تکمیلی دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت مالی درانجام این تحقیق قدردانی شده و ضمنا، ازدانشگاه گنت نیزدرراستای انجام این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Sattari, M. Ichthyology (1), Anatomy and Physiology. 1st Ed. Guilan: Universityof Guilan&NaghshMehr Pub; 2002; (In Persian).

2. Nematollahi A, Shafiie S. CLASIFICATAION OF FISH with Emphasis on Iranian Fish. Tehran: MabnayeKherad Pub; 2010. (In Persian).

3. Stoskopf M, Fish Medicine. ART Sciences LLC co; Second Edition. 2011.

4. Keivany Y. Biology of Fishes. Isfahan University of Technology Pub; 2005. (In Persian).

5. Bone, Q, Marshall, N.B. Biology of fishes. 2th Ed. Blackie Academic & Professional; 1995.

6. Decostere A, Turnbull JF, Ducatelle R, Haesebrouck F. Development of a gill perfusion apparatus for studying the interaction of fish pathogens with gill tissue. Altern Lab Anim: ATLA. 2000; 28(1): 53-61.

7. Decostere A, Henckaerts k, Ducatelle R, Haesebrouck F. An Alternative model to study the association of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss* L.) pathogens with the gill Tissue. Lab Anim. 2002; 36: 369-402.

8. Evans, D.H, Claibone, J.B. The physiology of Fishes: 3th Ed. New York: CRC press; 2006.

9. Lennernäs H. Human intestinal permeability. J Pharm Sci. 1998; 87(4): 403-410.

10. Handy RD, Musonda MM, Phillips C, Falla SJ. Mechanisms of gastrointestinal copper absorption in the African walking catfish: copper dose effects and a novel anion-dependent pathway in the intestine. J Exp Biol. 2000; 203(15): 2365-2377.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Curtis CG, Chein B, Bar-Or D, Ramu K. Organ perfusion and mass spectrometry: a timely merger for drug development. Curr Top Med Chem. 2002; 2(1): 77-86.

12. Glover CN, Hogstrand C. In vivo characterization of intestinal zinc uptake in fresh water rainbow trout. J Exp Biol. 2002; 205: 141-150.

13. Kimpe A, Decostere A, Hermans K, Mast J et al. Association of *Streptococcus gallolyticus*strains of high and low virulence with the intestinal tract of pigeons. Avian Dis. 2003; 47: 559-565.

14. Mourad FH. Animal and human models for studying of drugs on intestinal fluid transport in vivo. J PharmacolToxicol Methods. 2004; 50(1): 3-12.

15. Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Ducatelle R, et al. Adhesion of high and low virulence *Flavobacteriumpsychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). Dis Aquat Org. 2003; 55:101-107.

16. Dautrey S, Felice K, Petiet A, Lacour B. Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates. Br J Pharmacol. 1999; 127(7): 1728–1734.

17. Evans DH. Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium. J Exp Zool. 2002; 293(3): 336-347.

18. MacIntyre NR. Respiratory system simulations and modelling. Respir Care. 2004; 49(4): 401-409.

19. Perry S.F, Davie P.S, Daxboeck C, Ellis A.G, et al. Perfusion methods for the study of gill physiology. In: Hoar WS, Randall DJ, (eds). Fish Physiology. London: Academic Press; 1984; 325-55

20. Roden D, Matheson PJ, Carricato ND, Spain DA, et al. Immune-enhancing enteral diet selectively augments ileal blood flow in the rat. J Surg Res. 2002; 106(1): 25-30.

21. Wang J, Nation RL, Evans AM, Cox S. Isolated rat kidney perfused with dextran and bovine serum albumin: A stable model for investigating renal drug handling. J PharmacolToxicol Methods. 2004; 49(2): 105-113.

22. Decostere A, Haesebrouck F, Turnbull JF, Charlier G. Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacteriumcolumnare*strains to isolated gill arches. 1998 J Fish Dis. 22(1): 1-11.

23. Rankin JC, Maetz G. A perfused teleostean gill preparation: vascular actions of neurohypophysial hormones and catecholamines. J Endocrinol. 1971; 51(4): 621-635.

24. Smith, DG. Sites of cholinergic vasoconstriction in trout gills. Am J Physiol. 1977; 233(5): 222-229.

25. Shuttleworth TJ. A new isolated perfused gill preparation for the study of the mechanisms of ionic regulation in teleosts. CompBiochem Physiol. 1972; 43: 59-64.

26. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique.London: Methuen & Co. Ltd. 1959; 26(3): 21

27. Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Ducatelle R, et al . Development of a gut perfusion model as an alternative to the use of live fish. Lab Animal. 2005; 39: 194-199.

28. Harper GM, Monfort M, Saoud IP, Emery M, et al. An *ex vivo* approach to studying the interactions of *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J Aquac Res Development S1:004. Doi. 2011; 10: 4172/2155-9546.S1-004.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2013; 4(3): 313-322

Original Article

Histological and Electron Microscopy Study of the Intestinal Tissue of Rainbow Trout (*Oncorhynchusmykiss*): an *In Vitro* Model

Nematollahi A. Ph.D.[1, 2]*, Nourani H. Ph.D.[3], Malekian H, D.V.M[2]

1. Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Centre, Department of Animal Production, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium

2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

* Email corresponding author: anematolahi@yahoo.com

Received: 12 Feb. 2013 Accepted: 23 Jul. 2013

Archive of SID

Abstract

Aim: In the present study, a laboratory model was developed to study of histology and morphology of the digestive tract of rainbow trout.

Material and Methods: 20 fish (average weight=750 gr and average length =38 cm) were obtained. Fishes were anaesthetized using benzocain solution. Forty minutes later, fishes were killed and the heart, ventral and dorsal *aorta intestinalis* were exposed by ventral dissection. The preparation consisted of an excised gut tractus from rainbow trout, perfused through cannulation of the *aorta intestinalis ventralis* or *aorta intestinalis dorsalis* and suspended in a circular bath filled with Ringer solution. Different perfusion fluids such as Ringer, Cortland, Ringer + adrenaline and Cortland + adrenaline were tested. Un-perfused gut placed in Ringer solution served as the non-perfused gut tissue. After incubation time (60 and 180 min), samples of the gut were examined histologically and electron microscopically.

Results: Histological and Scanning electron microscopy results demonstrated that Cortland and Cortland + adrenaline solutions was effective in maintaining the gut tissue in a healthy condition for 60 and 180 min with only slight oedema and sloughing of the gut epithelium, respectively. Conversely, un-perfused gut revealed excessive tissue degeneration and severe necrosis.

Conclusion: This model approaches the *in vivo* situation and offers a means of maintaining the gut tissue intact outside the body of fish for enabling to study histology and morphology of gut epithelium under carefully controlled conditions.

Keywords: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Gut tissue, Cortland, An *in vitro* model

www.SID.ir