مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۳، ۵۲-۳۴۵
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.128767.2332

مطالعه هیستومرفومتریک، هیستوشیمی و الکترون میکروسکوپی سلول‌های جامی نواحی مختلف اپیدرم میش ماهی *Argyrosomus hololepidotus*

حسن مروتی* کاوه اسفندیاری حجت عنبرا
گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۹ دی ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۸ فروردین ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: پوست اولین سد دفاعی در مقابل محیط خارجی بوده و اعمال فیزیولوژیکی طبیعی داخل بدن را امکان پذیر می‌کند. لایه موکوس روی سطح بدن ماهی حاوی ترکیبات ضد میکروبی است که اولین لایه دفاعی بر علیه پاتوژن‌ها را فراهم می‌کند. موکوس به وسیله برخی از سلول‌های اپیدرم به نام سلول‌های جامی‌شکل ترشح می‌شود و عمدتا شامل موسین و دیگر گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد. **هدف:** مطالعه هیستومرفومتریک، هیستوشیمی و الکترون میکروسکوپی سلول‌های جامی نواحی مختلف اپیدرم میش ماهی. **روش کار:** در این پژوهش تعداد ۶ عدد میش ماهی مورد استفاده قرار گرفت و برای انجام مطالعات میکروسکوپی از ناحیه پشتی برش‌هایی به ضخامت ۰/۵ µ تهیه و مورد رنگ آمیزی AB، PAS، H&E (PH=۲/۵) و AB-PAS (PH=۲/۵) قرار گرفتند. برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی پس از ثبوت اولیه و ثانویه و آبگیری در داخل رزین آغشته گردیده و پس از تهیه برش‌های فوق نازك ۵۰ nm در داخل یورانیل استات رنگ آمیزی گردیدند. **نتایج:** میش ماهی در نواحی شکمی و پشتی دارای بیشترین و در نواحی دم دارای کمترین تعداد سلول موکوسی جامی شکل در ۱۰۰ µm از طول اپیدرم است. سلول‌های موکوسی جامی شکل در تمام نواحی وجود داشته و تعداد آن‌ها در نواحی مختلف متفاوت است اما ماهیت موکوسی این سلول‌ها در نواحی مختلف یکسان است و به رنگ‌های PAS و AB با PH=۲/۵ واکنش مثبت نشان می‌دهند. نتایج الکترون میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های جامی ترشح کننده موکوس در ضخامت اپیدرم مهاجرت می‌کنند و حاوی قطرات موکوس می‌باشند. **نتیجه گیری نهایی:** سلول‌های موکوسی جامی شکل در اپیدرم تمام نواحی میش ماهی جود داشته و دارای ماهیت موکوسی یکسانی است.

واژه‌های کلیدی: هیستوشیمی، پوست، میش ماهی، اپیدرم، سلول موکوسی جامی شکل

مقدمه

اولین سد دفاعی بدن ماهی در مقابل محیط خارجی، ماده موکوسی اطراف پوست است و در سلامت و بهداشت ماهیان نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۰). اپیدرم ماهیان دارای ترشحات با منشأ متفاوتی است که حاوی نسبت‌های متفاوت موکوس و پروتئین می‌باشد. این ترشحات حاوی موادی مانند کرینوتوکسین‌ها، کالمودولین‌ها، فرمون‌ها و انواعی از مواد ضد عوامل بیماری‌زا مانند ایمونوگلوبولین‌ها، اجزای کمپلمان، لیزوزیم، آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین، لکتین‌ها و سایر پپتیدها و پروتئین‌های ضدمیکروبی است (۹، ۶، ۲). موکوس کاهنده اصطکاک است و به ماهی کمک می‌کند تا با سرعت بیش‌تر و صرف انرژی کم‌تر به حرکت خود ادامه دهد (۱۲). سلول‌های جامی شکل ترشح‌کننده موکوس، غددی تک‌سلولی است که با ترشحات برون ریز خود، پوشش لزج سطح بدن ماهیان را به وجود می‌آورند (۲۲). سلول‌های جامی‌شکل در برخی از ماهیان به صورت دستجاتی در نواحی مختلف بدن تجمع می‌یابند و غدد هولوکرین چند سلولی را تشکیل می‌دهند (۱۲). سلول‌های مذکور حاصل تقسیمات میتوز سلول‌های پوششی استوانه‌ای مستقر روی غشای پایه است (۱۸) و سیتوپلاسم آن‌ها نسبت به رنگ‌آمیزی PAS و آلکالین آبی واکنش مثبت نشان می‌دهد (۲۱). سلول‌های جامی‌شکل ترشح کننده موکوس، سلول‌های موکوسی خنثی، سلول‌های اصلی ترشح‌کننده موکوس، سلول Becherzelln، سلول Keleinsten sheleimzellen، سلول Calciformes و Cellules muqueuses of mucipares نام‌های متفاوتی می‌باشند که توسط محققین مختلف به سلول‌های مذکور نسبت داده شده است (۱۲، ۵). 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 درجه حرارت و pH آب تغییر می‌کند (۵، ۱۰). اندازه، شکل، فراوانی و پراکندگی این سلول‌ها در نواحی مختلف پوست یک ماهی و گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت است (۱۲). معمولاً هنگامی که ترشحات موکوسی کامل و آماده آزادسازی می‌شوند، هسته و اندامک‌های سلولی به طرف قاعده سلول فشرده می‌شوند، غشای این سلول‌ها پس از رسیدن به سطح اپیدرم، از نقطه رأسی پاره و محتویات سلول به سطح پوست بدن ماهی آزاد می‌شود. از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی، هسته سلول‌های جامی شکل بر خلاف سلول‌های پوششی فاقد چین‌خوردگی می‌باشند و این سلول‌ها واجد شبکه آندوپلاسمی خشن فراوان و دستگاه گلژی واضح هستند (۷). تعداد این سلول‌ها ممکن است در بین جنس‌های نر و ماده یک گونه ماهی متفاوت باشد. تغییرات محیطی مانند مواجه شدن با اشعه ماوراء بنفش، تغییرات ناگهانی دما، آلاینده‌ها و آب‌های اسیدی نیز می‌توانند بر تعداد سلول‌های جامی شکل اپیدرم تأثیر بگذارند (۷،۸). شواهدی مبنی بر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۷۱۱۷-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: hmorovvati@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

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 (۱۳). مواجهه حاد با یک ماده 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 ماده 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. عوامل استرس‌زا مانند دست‌کاری یک ماهی می‌تواند باعث افزایش تعداد سلول‌های جامی‌شکل اپیدرم پوست بدن ماهی شود. در برخی از گونه‌ها مانند آزادماهیان، بخش اعظم ترشحات موکوسی اپیدرم از سلول‌های جامی شکل منشأ می‌گیرند (۲۲، ۱۶). سلول‌های جامی شکل دارای توانایی بیگانه‌خواری نیز هستند و در هنگام التیام زخم به دفع بقایای سلولی از پوست کمک می‌کنند (۷). یک روش تشخیصی معمول و متداول در تشخیص بسیاری از بیماری‌ها، آزمایش‌های سیتولوژیک از نمونه‌های پوستی است (۲۰). در ساختار بافتی پوست در بین گونه‌های مختلف ماهیان تنوع مرفولوژیک و عملکردی بسیار وسیع است (۱۲، ۵). از آن جایی که گزارش‌های قابل توجهی در خصوص پراکندگی سلول‌های جامی‌شکل اپیدرم میش ماهی وجود ندارد، مطالعه حاضر از اهمیت خاصی برخوردار است.

مواد و روش کار

در این پژوهش تعداد شش قطعه میش ماهی معمولی سالم و بالغ نر و ماده با میانگین وزنی ۰/۸۱۶±۱۴/۸۳ kg و میانگین طول ۴/۰۸±۱۱۴/۱۶ cm به صورت تازه صید شده از سواحل خلیج فارس تهیه گردید. به منظور مطالعه حاضر، از پوست نواحی مختلف بدن شامل سر، نواحی پشتی (زیر باله پشتی)، شکمی و دم نمونه‌هایی به ضخامت حداکثر ۵ mm تهیه و در فرمالین بافر ۱۰٪ فیکس و جهت تهیه مقاطع میکروسکوپیک از نمونه‌های مورد نظر از روش معمول تهیه مقاطع بافتی استفاده گردید. در این مرحله از پژوهش، با تهیه برش‌هایی از قسمت‌های مختلف پوست و رنگ آمیزی آن‌ها به وسیله رنگ هماتوکسیلین- ائوزین، اپیدرم و مشخصه سلول‌های ترشح کننده موکوس مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت که نتایج این مطالعه با استفاده از تصاویر میکروسکوپی ارائه گردید. برش‌ها مورد رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E)، پریودیک اسید شیف (PAS) Alcian Blue (۲/۵ = PH) و Alcian Blue (PAS) (۲/۵ = PH) قرار گرفته و مطالعات هیستولوژی، هیستومتریک و هیستوشیمی روی آن‌ها انجام گردید. در مطالعات هیستومتریک تعداد سلول‌های جامی‌شکل اپیدرم میش ماهی در نواحی مختلف بدن شمارش شده و مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گرفت. برای شمارش سلول‌ها حداقل پنج برش بافتی از هر نمونه و

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار تعداد سلول‌های موکوسی جامی شکل در µm ۱۰۰ از طول اپیدرم.

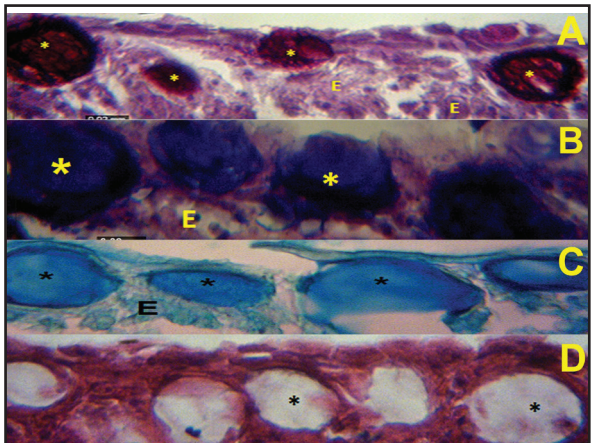
ناحیه سر Mean ± SD	۲/۷۳±۰/۲۴
ناحیه شکمی Mean ± SD	۳/۰۱±۰/۲۶
ناحیه پشتی Mean ± SD	۳ ±۰/۱۹
ناحیه دم Mean ± SD	۱/۴۵ ± ۰/۱۶

در هر برش حداقل پنج میدان دید میکروسکوپی با عدسی شیئی ×۱۰ و در طول ۱۰۰ µm از اپیدرم هر ناحیه مورد شمارش قرار گرفت. برای مطالعه هیستومتریک از میکروسکوپ نوری مجهز به لنز دیجیتال Dino Lite و نرم افزار Dino Capture استفاده گردید. نتایج هیستومتری بدست آمده پس از تجزیه و تحلیل آماری به کمک جداول ارائه گردید. به منظور مطالعات هیستوشیمی و مشخص کردن نوع موکوس ترشحی داخل سلول‌های اپیدرم میش ماهی نمونه‌های بافتی با رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS)، Alcian Blue (۲/۵=PH) و (PAS)-(۲/۵=PH) Alcian Blue رنگ شده و مورد بررسی و تفسیر قرار گرفتند. جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نمونه مورد نظر در محلول گلوتارآلدئید سرد ۴٪ قرار گرفت و در نهایت ساختار دقیق پوست نواحی مختلف میش ماهی با استفاده از تصاویر میکروسکوپی بدست آمده مورد بررسی دقیق بافت شناسی قرار گرفت. برای آماده سازی نمونه‌ها جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی پس از ثبوت با محلول گلوتارآلدئید ۴ ٪، با استفاده از ۰/۱ M sodium cacodylate buffer، در ۳ مرحله و هر مرحله به مدت ۱۵ دقیقه شستشو شدند. در ادامه برای ثبوت ثانویه نمونه‌ها به مدت h ۲ ساعت در تتراکسید ازمیوم Osmium Tetroxide ۱ ٪ قرار گرفتند و سپس برای شستشو مجددا با استفاده از ۰/۱ M sodium cacodylate buffer، در ۳ مرحله و هر مرحله به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و برای آب گیری در این مرحله از غلظت‌های افزاینده استون استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه‌ها به ترتیب در استون ۳۰، ۵۰، ۷۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ ٪ هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس جهت آغشتگی با رزین عمل مخلوط کردن رزین با استون با نسبت‌های ۳ حجم از استون به همراه ۱ حجم رزین به مدت ۳ ساعت، نسبت ۱به ۱ هر دو ماده به مدت ۲۴ ساعت، ۳ حجم رزین به همراه یك حجم از استون به مدت ۳ ساعت و در نهایت استفاده از رزین خالص به مدت ۵ ساعت صورت گرفت. در این تحقیق برای قالب گیری از رزین خالص استفاده گردید. در مرحله پلیمریزاسیون، نمونه‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۰°C تا ۷۰ قرار داده شدند و در نهایت جهت تهیه برش از دستگاه اولترامیکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵۰ nm از نمونه‌ها تهیه شد و برای رنگ آمیزی برش‌های فوق‌نازك از استات یورانیل استفاده گردید و در نهایت از برش‌های تهیه شده توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی Zeiss - EM۱۰C - ۸۰ KV ساخت کشور آلمان عکس‌برداری شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲. مقایسه تعداد سلول‌های جامی شکل نواحی مختلف پوست میش ماهی در طول µm۱۰۰ از اپیدرم (p<۰/۰۵).

	ناحیه سر	ناحیه شکمی	ناحیه پشتی	ناحیه دم
ناحیه سر	-	۰/۲۳	۰/۲۸	۰/۰۰۰
ناحیه شکمی	۰/۲۳	-	۰/۹۹۹	۰/۰۰۰
ناحیه پشتی	۰/۲۸	۰/۹۹۹	-	۰/۰۰۰
ناحیه دم	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	-



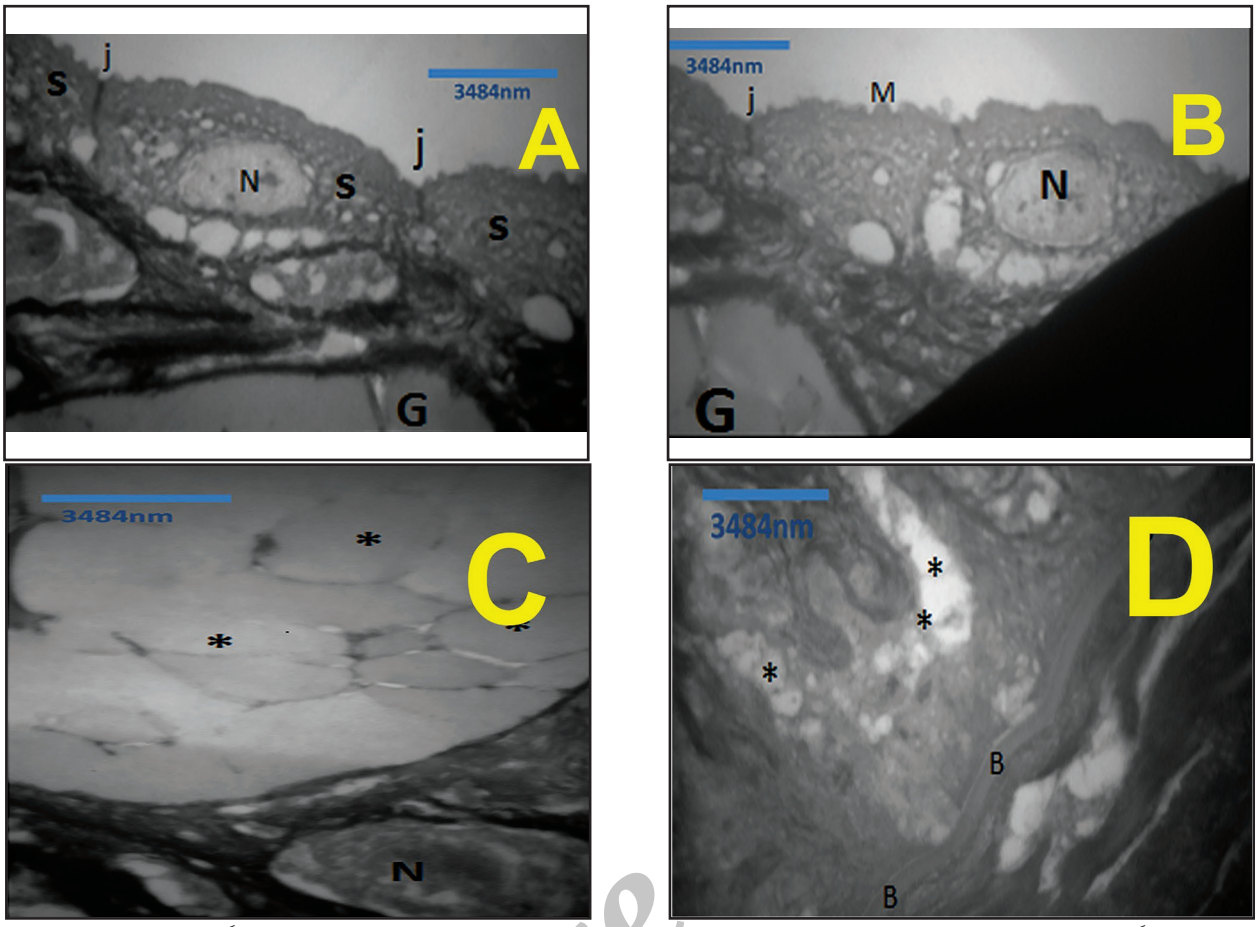
تصویر۱. اپیدرم نواحی مختلف میش ماهی (H&E,۴۰×). سلول‌های جامی (*) در میان سلول‌های پوششی اپیدرم (E). بخش :A رنگ آمیزی PAS، بخش :B رنگ آمیزی PAS- AB (PH=۲/۵)، بخش :C رنگ آمیزی، (AB,PH=۲/۵)، بخش D رنگ آمیزی H&E.

نتایج

در مشاهدات میکروسکوپی و نتایج هیستولوژی مشخص گردیدکه اپیدرم تمام نواحی پوست میش ماهی شامل سلول‌های جامی‌شکل و دیگرسلول‌های پوششی می‌باشد. حد فاصل سلول‌های جامی‌شکل سلول‌های پوششی قرار می‌گیرند. سلول‌های جامی‌شکل اپیدرم شبیه یک جام بوده و به راحتی از سایر سلول‌های اپیدرمی قابل تشخیص و شناسایی می‌باشند. در رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین محتویات موکوسی داخل سیتوپلاسم سلول‌های جامی توسط الکل و گزیلول شسته شده و رنگی به خود نگرفت (تصویر۱). نتایج هیستوشیمی نشان داد که محتویات موکوسی سلول‌های مذکور در اپیدرم تمام نواحی نمونه برداری شده از پوست بدن میش ماهی حاوی گلیکوژن و گلیکوپروتئینی با PH خنثی و قابل اکسیداسیون است و به رنگ PAS به شدت واکنش نشان داد و رنگ ارغوانی به خود گرفتند (تصویر۱). همچنین در اپیدرم تمام نواحی نمونه برداری شده از پوست بدن میش ماهی، محتویات موکوسی سلول‌های مذکور به رنگ آمیزی (AB, PH = ۲/۵) نیز واکنش مثبت نشان داده و رنگ آبی به خود گرفتند. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های موکوسی جامی شکل نواحی مختلف پوست بدن میش ماهی حاوی موسین اسیدی (دارای موسین‌های با اسید سیالیکی حاوی گلیکوپروتئین سولفاته و کربوکسیله غیر سولفاته) بوده و رنگ آبی به خود گرفتند (تصویر۱). به همین دلیل این سلول‌ها در رنگ‌آمیزی (PAS-۲/۵ = AB, PH) همزمان رنگ آبی و ارغوانی را به خود گرفتند و بنفش شدند (تصویر۱). هر چند اپیدرم پوست دارای ساختار بافت‌شناسی و هیستوشیمی عمومی یکسانی می‌باشد ولی از نظر پراکندگی سلول‌های موکوسی جامی شکل اپیدرم اختلافات قابل توجهی وجود دارد. تعداد سلول‌های ترشح کننده موکوس اپیدرم میش ماهی در µm ۱۰۰ از طول اپیدرم هر ناحیه مورد شمارش و بررسی آماری قرار گرفت و نتایج نشان داد که سلول‌های موکوسی جامی شکل با ۳/۰۱ و ۳ عدد سلول در اپیدرم نواحی شکمی و پشتی از بیشترین تعداد و با ۱/۴۵ عدد سلول در اپیدرم ناحیه دم از کمترین تعداد برخوردار است. تعداد این سلول‌ها در ناحیه سر ۲/۷۳ عدد سلول در µm ۱۰۰ از طول اپیدرم است (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های آماری و مقایسه دو به دو نواحی مختلف اپیدرم از نظر تعداد و پراکنش سلول‌های جامی‌شکل، ناحیه دم میش ماهی در مقایسه با نواحی سر، شکمی و پشتی میش ماهی دارای اختلاف معنی‌داری بود (جدول ۲).

نتایج حاصل از تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان دادند که سلول‌های جامی نابالغ در نزدیکی غشاء پایه و در لایه بازال اپیدرم حاوی قطره‌های کوچک موکوسی در غشاءهای کوچک گلژی است (تصویر۲ بخش D). سلول‌های جامی بالغ دارای قطرات متعدد حاوی موکوس در داخل سیتوپلاسم وسیع خود است (تصویر ۲ بخش C). قطره‌های بزرگ حاوی موکوس فراوان موجود در سیتوپلاسم وسیع سلول‌های موکوسی جامی شکل پس از وسعت گرفتن، هسته و سایر اندامک‌های سیتوپلاسمی اطراف هسته را به گوشه‌ای از سلول هل می‌دهند (تصویر ۲ بخش C). این سلول‌ها در حال مهاجرت و حرکت از لایه‌های عمقی به سمت لایه‌های سطحی اپیدرم می‌باشند. سلول جامی خود را به لایه‌های سطحی اپیدرم نزدیک کرده و از ناحیه راسی خود به طرف اتصالات محکم بین دو سلول سنگفرشی برجسته می‌شوند. به نظر می‌رسد پس از کنار زدن دو سلول سنگفرشی سطحی در قسمتی از ناحیه اتصالات محکم بین سلولی، خود را به سطح اپیدرم پوست رسانده، می‌ترکند و ترشحات موکوسی خود را بر روی سطح اپیدرم می‌ریزند (تصویر ۲ بخش B و A). سلول‌های مذکور ترشحات موکوسی خود را بر روی میکروریج‌های سطحی حاصل از بیرون‌زدگی‌های متوالی غشاء بیرونی سلول‌های سنگفرشی سطحی اپیدرم می‌ریزند. میکروریج‌های سلول‌های سنگفرشی با ایجاد برآمدگی‌های متوالی بر روی غشاء سلول‌های سنگفرشی سبب

Archive of SID
www.SID.ir



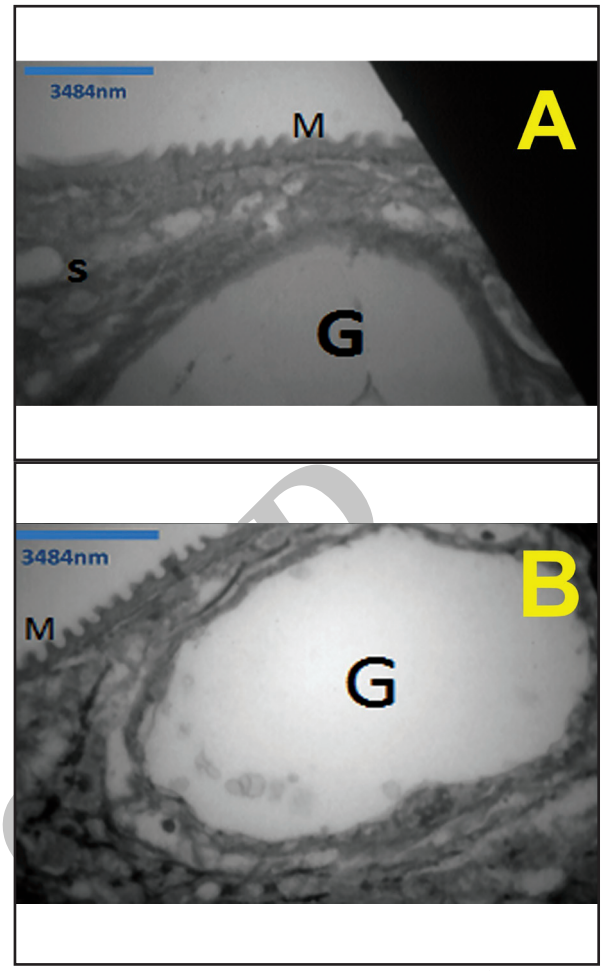
تصویر۲. میکروگراف الکترونی عبوری از نواحی پشتی اپیدرم میش ماهی (×۲۵۰۰). سلول موکوسی جامی (G)، اتصالات محکم (j)، سلول سنگفرشی (s)، هسته (N)، قطرات کوچک موکوسی داخل سلول موکوسی جامی شکل (*)، غشاء پایه(B)، سلول سنگفرشی(s).

چسبندگی موکوس ترشح شده از سلول‌های جامی به پوست بدن میش ماهی می‌شوند (تصویر ۳ بخش A). ترشحات سلول‌های جامی هولوکرینی بوده و با مرگ سلول همراه است (تصویر ۳ بخش B).

بحث

Burton و Fletcher در سال ۱۹۸۳ تغییرات شدیدی در تعداد سلول‌های ترشح کننده موکوس در یک جمعیت ساحلی کفشک زمستانی (Pseudopleuronectes Americanus) در منطقه Walbaum مشاهده کردند. در طول پاییز و کمی قبل از شروع زمستان، قبل از زمان تخم‌ریزی افزایش معنی‌داری در فراوانی سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اتفاق می‌افتد، که در جنس ماده بیشتر از جنس نر مشهود است. فراوانی سلول‌های ترشح کننده موکوس در اواسط زمستان (June- march) زمانی که فعالیت معمول در ماهی پایین است کاهش می‌یابد (۴). Pickering در سال ۱۹۷۶ یک تغییر فصلی در اپیدرم قزل آلای قهوه‌ای مشاهده نمود و بیان کرد تعداد سلول‌های ترشح کننده موکوس دستخوش تغییرات مشخصی در دوره‌های متوالی تخم ریزی می‌گردد و در طول زمان تخم‌ریزی کاهش شدیدی در غلظت سلول‌های ترشح کننده موکوس اپیدرم مشاهده شده است. دلیل این تغییرات احتمالاً بستگی به فاکتورهای هورمونی دارد که اپیدرم ماهیان استخوانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۴). البته Wilkins در سال ۱۹۷۹ بیان کرد که در زمان بلوغ جنسی، فراوانی سلول‌های موکوسی با افزایش تغذیه زیاد می‌شود و می‌توان این اختلاف را در ارتباط با اختلافات هورمونی بیان کرد (۲۳). همچنین Mc Bride در سال ۱۹۷۱ در درمان جنس نر ماهی *Oncorhynchus nerka* با آندروژن، افزایش قابل ملاحظه‌ای را در سلول‌های ترشح کننده موکوس مشاهده کرد (۱۱). Yamamoto در تحقیق بر روی کفشک ژاپنی بیان نمود که این ماهی برای کاهش دادن اصطکاک, تراکم سلول‌های موکوسی را در سطح پشتی خود افزایش داده است (۲۴). همچنین Pickering در سال ۲۰۰۶ در تحقیقی با عنوان اثر تغییرات فصلی در اپیدرم قزل‌آلای قهوه‌ای نشان داد که تعداد سلول‌های ترشح کننده موکوس دستخوش تغییرات مشخصی در دوره‌های متوالی تخم ریزی می‌شود. در طول زمان تخم ریزی کاهش شدیدی در غلظت سلول‌های ترشح کننده موکوس اپیدرم مشاهده می‌شود و دلیل این تغییرات احتمالاً بستگی به فاکتورهای هورمونی دارد (۱۴). Pickring در سال ۱۹۷۳ با مطالعه بر روی دو گونه ماهی سالمون گزارش داد که سلول‌های موکوسی دارای یک الگوی

Archive
www.SID.ir



تصویر۳. میکروگراف الکترونی عبوری از نواحی پشتی اپیدرم میش ماهی (×۲۵۰۰). سلول موکوسی جامی (G) میکروریج‌ها (M) سلول سنگفرشی (S).

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 جابجا 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 (۱۵). نتایج بررسی کلی مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های موکوسی جامی شکل با ۳/۰۱ و ۳ عدد سلول در نواحی شکمی و پشتی از بیشترین تعداد و با ۱/۴۵ عدد سلول در ناحیه دم از کمترین تعداد بر خوردار است. تعداد این سلول‌ها در ناحیه سر ۲/۷۳ عدد سلول در ۱۰۰ µm از طول اپیدرم است. به نظر می‌رسد که سطح پوست نواحی دم میش ماهی موکوس را از نواحی جلویی دریافت می‌کند و تعداد سلول‌های مذکور را در این نواحی کاهش داده است. Pinky و Mittal در سال ۲۰۰۸ جهت مطالعه هیستوشیمی گلیکوپروتئین‌های سلول‌های اپیدرمی ناحیه لب ماهی *Garra lamta* از رنگ آمیزی عمومی H&E و رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی و تکمیلی هیستوشیمی و نیز از رنگ آمیزی‌های اختصاصی AB (PH=۱) و AB (PH=۲/۵) 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 غیرسولفاته و موسین حاوی گلیکوپروتئین قابل اکسیداسیون و خنثی می‌باشند (۱۷). Al-Bana و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه هیستوشیمیایی را با استفاده از روش معمول هیستوشیمیایی کربوهیدرات جهت شناسایی ترکیبات قندی در ۱۰ ناحیه از پوست گربه ماهی انجام دادند. رنگ آمیزی معمول ترکیبات کربوهیدرات نشان داد که سلول‌های جامی شکل موکوس حاوی مقادیر قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات کربوهیدرات در تمام نواحی پوست می‌باشند در حالی که نوع دیگر سلول‌ها یعنی سلول‌های گرزی‌شکل فاقد این ترکیبات بودند (۱). Saxena و Kulshrestha در سال ۱۹۸۱ با مطالعه اپیدرم پوست ماهی Mystus vittatus بیان کردند اپیدرم، حاوی دو نوع سلول موکوسی می‌باشد که ترشحات متفاوتی دارند. نوع اول سلول‌های موکوسی جامی‌شکل که حاوی موکوس خنثی و مقاوم به 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. همچنین هر دو سلول مذکور به رنگ‌آمیزی (AB,PH=۲/۵) واکنش مثبت نشان می‌دهند (۱۹). میش ماهی در اپیدرم تمام نواحی خود فاقد سلول‌های هشدار دهنده گرزی شکل است و سلول‌های جامی وظیفه ترشح کامل موکوس را بر عهده دارند. به همین دلیل سلول‌های جامی شکل اپیدرم نواحی مختلف میش ماهی وظیفه تولید موسین حاوی گلیکوژن و گلیکوپروتئینی با PH خنثی و قابل اکسیداسیون و موسین اسیدی (دارای موسین‌های با اسید سیالیکی حاوی گلیکوپروتئین سولفاته و کربوکسیله غیرسولفاته) بر عهده دارند. Stoskopf بیان کرد سلول‌های جامی‌شکل به سمت سطح اپیدرم مهاجرت کرده و ترشحات خود را به سطح اپیدرم خارج می‌کنند. غشای سلولی آن‌ها از سطح رأسی سلول پاره شده و محتویات خود را آزاد می‌کند و سپس سلول از بین می‌رود. غالباً سلول‌های جامی‌شکل فرسوده که ترشحات خود را آزاد کرده‌اند، در مقاطع بافت‌شناسی مشاهده می‌شوند (۲۰). در تصاویر بدست آمده از پژوهش حاضر تعدادی سلول جامی شکل پس از ترشح مشاهده گردید. سلول‌های جامی شکل پس از ترشح در رنگ آمیزی‌های اختصاصی رنگی به خود نمی‌گیرند. Brown and Wellings با مطالعه الکترون میکروسکوپی عبوری بر روی پوست بدن *Hippoglossoides elassodon* تصاویری منتشر کردند که نشان می‌داد سلول‌های جامی ترشح کننده موکوس اپیدرم دارای قطرات متعددی

Archive of SID

است. سـلول‌های جامی نابالغ که در نزدیکی لایه بازال قرار دارند قطرات موکوس را در غشاء گلژی ایجاد و ذخیره می‌کنند. همچنین تصاویر آن‌ها نشـان داد قطرات متعدد و وسعت یافته موجود در سلول‌های جامی شکل ترشح کننده موکوس هسته و دیگر اندامک‌های سیتوپلاسمی اطراف هسته را به گوشه‌ای از سلول هل می‌دهند. سلول‌های مذکور از لایه‌های عمقی اپیدرم به سمت لایه‌های سطحی اپیدرم پیوسته در حال مهاجرت می‌باشند و ترشحات هولوکرینی خود را به سطح اپیدرم می‌ریزند (۳). تصاویر بدست آمده از سلول‌های جامی شکل اپیدرم پوست بدن میش ماهی با یافته‌های Brown and Wellings کامـلاً مطابقبـت داشـت. تصاویر الکترونی عبوری مطالعه حاضر بیانگر مهاجرت سلول‌های موکوسی جامی شکل در ضخامت اپیدرم به سمت لایه‌های سطحی اپیدرم است.

در مجموع می‌توان نتیجه گیری کرد که سـلول‌های موکوسی جامی شکل در تمام نواحی اپیدرم میش ماهی وجود داشته و این سلول‌ها دارای ماهیت موکوسی یکسانی در نواحی مذکور می‌باشند.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشـی دانشگاه تهران جهت پشتیبانی و تأمین هزینه‌های این طرح، سپاس‌گزاری می‌شود.

References

1. Al-Banaw, A., Kenngott, R., Al-Hassan J.M., Mehana, N., Sinowatz, F. (2010) Histochemical analysis of glycoconjugates in the skin of a catfish (*Arius tenuispinis*, day). Anat Histol Embryol. 39: 42-50. doi: https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2009.00977.x. PMID: 19839984.
2. Alexander, J.B., Ingram, G.A. (1992) Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. Ann Rev Fish Dis. 2: 249-279. doi: https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90066-7.
3. Brown, G.A., Wellings, S.R. (1970) Electron microscopy of the skin of the teleost, *Hippoglossoides elassodon*. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 103: 149-169. PMID: 5412825.
4. Burton, D., Flefcher, G.L. (1983) Seasonal changes in the epidermis of the winter flounder, Pseudopleuronectes americanus. J Mar Biol Assoc UK. 63: 273-287. doi: https://doi.org/10.1017/S0025315400070661.
5. Elliott, D.G. (2000) Integumentary system. In: The Laboratory Fish. Ostranfer, G.(eds.). (1st ed.) Academic Press. NewYork, USA. p. 95-479.
6. Fast, M., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A., Ross, N.W. (2002) Skin morphology and humeral non-specific defense parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 132: 645-657. PMID: 12044774.
7. Iger, Y., Jenner, H., Bonga, S. (1994) Cellular responses in the skin of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to temperature elevation. J Fish Boil. 44: 921-935. doi: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb01265.x.
8. Kaweewat, K., Hofer, R. (1997) Effect of UV-B radiation on goblet cells in the skin of different fish species. J Photochem Photobiol. 41: 222-226. doi: https://doi.org/10.1016/S1011-1344(97)00104-8.
9. Kosuga, Y., Mano, N., Hirose, H. (2000) Bacterial agglutinins in the skin mucus of Japanese eel. Fish Pathol. 35: 73-77. doi: https://doi.org/10.3147/jsfp.35.73.
10. McKim, J.M., Lien, G.L. (2001) Toxic responses of the Skin. In: Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. Schlenk, D. and Benson, W.H. (eds.). (1st ed.) Taylor and Francis. London, UK. p. 151-224.
11. McBride, J.R., Van Overbeeke, A.P. (1971) Effects of androgens, estrogen and cortisol on the skin, stomach, liver, pancreas and kidney in gonadectomized adult sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). J Fish Res Board Can. 28: 485-490. doi: https://doi.org/10.1139/f71-068.
12. 12. Mittal, A. K. (1997) Fish Epidermis. In: Advances in Fish Research. sing, B.R.(eds.). (2nd ed) Narendra Publishing House. Delhi, India. p. 43-62.
13. Nakamura, O., Saeki, M., Kamiya, H., Muramoto, K., Watanabe, T. (2002) Development of epidermal and mucusal galectin containing cells in metamorphosing leptocephali of Japanese conger. J Fish Biol. 61: 822-833. doi: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00913.x.
14. Pickering, A.D. (1977) Seasonal changes in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.), J Fish Biol. 10: 561-566. doi: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04088.x.
15. Pickering, A.D. (1974) The distribution of mu-

Archive of SID
www.SID.ir

cous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). J Fish Biol. 6: 111-118. doi: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1974.tb04531.x.

16. Pickering, A.D., Macey, D.J. (1976) Structure, histochemistry and the effect of handling on the mucous cells of the epidermis of the char *Salvelinus alpinus* (L.). J Fish Biol. 10: 505-512. doi: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04083.x.
17. Pinky, 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. Anat Histol Embryol. 37: 101-113. doi: https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2007.00816.x. PMID: 17986310.
18. Roberts, R.J. (2001) Fish pathology. Ronald, J.R. (eds.). (3rd ed.) W.B. Saunders Co. London, UK.
19. Saxena, M., Kulshrestha, S.K. (1981). Histochemical studies of mucosubstances in the epidermis of a nonscaly teleost Mystus (Mystus) vittatus BI. Histochem Cell Biol. 72: 155-160.
20. Stoskopf, M.K. (1993) Fish Medicine. (1st ed.) W.B. Saunders Co. Philadelphia, USA. p. 31-33.
21. Takashi, F., Hibiya, T. (1994) An Atlas of Fish Histology: normal and pathological features. Hibiya, T.(eds.). (2nd ed.) Collage of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University. Tokyo, Japan. p. 8-15.
22. Whitear, M. (1986) The skin of fishes including cycolostoms epidermis and dermis. In: Biology of the Integument. Bereiter-Hahn, J., Maltoltsy, A.G. and Richards, K.S.(eds.). (1st ed.) Springer. Berlin, Germany. p. 8-64.
23. Wilkins, N.P., Jancsar, S. (1979) Temporal variations in the skin of Atlantic salmon, *Salmo salar*. J Fish Biol. 15: 299-307. doi: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1979.tb03609.x
24. Yamamoto, T., Kawai, K., Oshima, S. (2011) Distribution of mucous cells on the body surface of Japanese flounder Paralichthys olivaceus. J Fish Boil. 78: 848-859. doi: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02898.x. PMID: 21366577.

Archive of SID

Histomorphometrical, Histochemical and Electron Microscopic Studies of Goblet Mucous Cells in Different Regions of *Argyrosomus hololepidotus* Epidermis

Morovvati, H.*, Esfandiari, K., Anbara, H.

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
(Received 9 January 2018, Accepted 17 April 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Skin is the first line of defense against the external environment and it is possible to maintain the natural physiological functions in the body. The mucus layer on the surface of the fish body contains anti-microbial combination that provides the first layer of defense against pathogens. The mucus is released by some of the epidermis cells which are called goblet cells and it mostly contains the mucin and other glycoproteins. **OBJECTIVES:** Histomorphometrical, Histochemical and Electron Microscopic Studies of Goblet Mucous Cells in Different Regions of *Argyrosomus hololepidotus* Epidermis. **METHODS:** In this study, six *Argyrosomus hololepidotus* are used and the structure of the fish's skin was studied. For doing this microscopic study, the sampling was done on dorsal regions of fish with a thickness of 0.5µ then they were stained with H & E, PAS, AB (PH =2.5) and AB (PH=2.5)-PAS. For electron microscopic study, the samples after primary and post-fixation were dehydrated and were embedded in resin. Then, thin sections 50 µm were prepared and stained with uranyl acetate. **RESULTS:** *Argyrosomus hololepidotus* fish has maximum goblet cells in ventral and dorsal skin and minimum numbers of goblet cells were seen in tail skin in 100 µm length of epidermis. There were goblet mucous cells containing mucous in the *Argyrosomus hololepidotus* epidermal whose numbers were different in difference areas but mucus components were similar in different areas and they reacted positively to PAS and AB dyes with PH=2.5.The electron microscopic results of this study showed that goblet cells immigrate in thickness of epidermis and they include mucosal drops. **CONCLUSIONS:** There are goblet mucus cells in all parts of *Argyrosomus hololepidotus* Epidermis and they have similar mucus nature.

Keyword: Histochemistry, Skin, *Argyrosomus hololepidotus*, Epidermis, Goblet mucous cell

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean and standard deviation of goblet mucous cells in different regions of *Argyrosomus hololepidotus* epidermis in 100µm length of epidermis.

Table 2. Comparison the number of goblet mucous cells in different regions of *Argyrosomus hololepidotus* epidermis in 100µm length of epidermis. ($p<0.05$).

Figure 1. Different Regions of *Argyrosomus hololepidotus* Epidermis (H&E, 40×). Goblet mucus cells (*) between the epithelial cells of the epidermis (E). Part A: PAS stained, part B: AB (PH = 2.5) -PAS stained, part C: AB (PH = 2.5) stained, part D: H&E stained.

Figure 2. Transmission electron micrograph from Dorsal Regions of *Argyrosomus hololepidotus* Epidermis (2500×). Goblet mucus cell (G), tight junction (j), squamous cell(S), nucleus (N), small droplets of mucus inside the goblet mucous cells (*), basement membrane (B), squamous cell (s).

Figure 3. Transmission electron micrograph from Dorsal Regions of *Argyrosomus hololepidotus* Epidermis (2500×). Goblet mucus cell (G), microridges, squamous cell(S).

***Corresponding author's email: hmorovvati@ut.ac.ir, Tel: 021-61117117, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir