مطالعه بافت شناسی طحال، کبد و روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

زهرا مینوش سیاوش حقیقی[1]، مصطفی اخلاقی*[2]، هادی منصوری[2]

تاریخ دریافت: ۸۹/٦/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۲۷

چکیده

در این مطالعه، بافت شناسی برخی از اعضای داخلی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان که نقش موثری در متابولیسم و فعالیت سیستم ایمنی ماهی به عهده دارند، مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور بافت‌های طحال، کبد و روده قدامی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در سطح میکروسکوپ نوری و الکترونی بررسی شدند. نتایج بدست آمده نشان داد کپسول نازک طحال از بافت همبند سست تشکیل شده و حاوی سلول‌های مزوتلیومی می‌باشد. پارانشیم طحال از دو قسمت پالپ سفید و قرمز تشکیل شده که تراکم ناحیه پالپ سفید به مراتب بیشتر است. سلول‌های مزانشیمی در پارانشیم طحال دارای هسته‌های بزرگ یوکروماتین هستند. لنفوسیت‌های موجود در طحال توسط زواید سیتوپلاسمی خود در تماس با یکدیگرند. کبد دارای سلولهای مزوتلیال در سطح کپسول است. هپاتوسیت‌های کبدی به صورت ردیف‌های نامنظم در لوبول‌ها قرار گرفته و توسط سینوزوئیدها از یکدیگر جدا می‌شوند. همچنین هپاتوسیت‌های دو هسته‌ای، شبکه اندوپلاسمی خشن، موئینه‌های صفراوی حاوی میکروویلی در بافت کبد مشاهده می‌شود. در روده قدامی لایه عضلانی مخاطی، سلول‌های گابلت و میکروویلی مشخص است. سلول‌های مخاطی روده قدامی دارای شبکه اندوپلاسمی خشن و میتوکندری فراوان می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: بافت شناسی، طحال، کبد ،روده، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ الکترونی

۱- دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی

۲- دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

- نویسنده‌ی مسئول مقاله: akhlaghi@shirazu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ساختارهای بافتی در ماهی‌ها اساساً مشابه مهره‌داران عالی‌تر است. اما از آنجا که این موجودات آبزی می‌باشند ویژگی‌های خاص فیزیولوژی و بافت شناسی به تخصصی شدن برخی ارگان‌ها و بروز تفاوت با حیوانات خشکی‌زی منجر شده است (Stoskopf, 1993). از جمله اعضای داخلی پر اهمیت در بدن ماهی طحال است که در اکثر ماهی‌ها از جمله قزل آلای رنگین کمان به صورت عضوی مجزا می‌باشد.

پارانشیم طحال در پستانداران شامل پالپ سفید غنی از لنفوسیت و پالپ قرمز مملو از گلبول‌های قرمز است که به‌صورت مجزا از هم قرار دارند. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که در طحال ماهی‌ها مرز پالپ‌های سفید و قرمز مشخص نمی‌باشد (Takashima and Hibiya, 1995). بودامر و همکاران (۱۹۹۰)، سلول‌های خونساز اصلی از جمله اریتروبلاست‌ها، اریتروسیت‌ها، لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها، ترومبوسیت‌ها، تعداد معدودی نوتروفیل بالغ و نابالغ، ائوزینوفیل و پلاسماسل را در طحال ماهی باس مخطط مشاهده نمودند. وجود مناطق مونوسیت ماکروفاژی در اطراف سرخرگ‌ها که در به دام انداختن آنتی‌ژن نقش دارند نیز توسط تاکاشیما (۱۹۹۵) گزارش شده است. این ماکروفاژها سپس مواد آنتی‌ژنی را به لنفوسیت‌های موجود در طناب‌های طحال ارائه می‌دهند از این‌رو طحال یک ارگان لنفاوی ثانویه محسوب می‌شود. در بعضی منابع وجود نوتروفیل و ائوزینوفیل به صورت بالغ و نابالغ در پارانشیم طحال ماهی گزارش شده است (Bodammer et al., 1990). وجود شبکهٔ اندوپلاسمی خشن فراوان در سلول‌های لنفوسیت حاکی از فعالیت شدید سنتزی و پروتئین‌سازی در این سلول‌ها می‌باشد.

کبد در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان دارای لوب‌های مجزا و مشخص نبوده و در قسمت قدامی حفره شکمی قرار می‌گیرد. کبد بیشتر به سمت چپ بدن متمایل بوده و از طریق مجرای کبدی به کیسه صفرا متصل می‌شود. کیسه صفرا محتویات خود را از طریق مجرای صفراوی به داخل انتهای پیلوری معده تخلیه می‌کند. بعضی محققین اکثر سلول‌های کبدی را حاوی یک هستک عنوان کرده‌اند (Amin et al., 1990; Stoskopf, 1993). بعضی منابع وجود مراکز ملانوماکروفاژی در کبد ماهی‌ها را در اثر بروز یک پاسخ التهابی بیان نموده‌اند (Stoskopf, 1993). شبکهٔ اندوپلاسمی صاف معمولاً کم بوده و در اطراف ذخایر گلیکوژنی یا در بین فضاهای دستگاه گلژی قرار می‌گیرند. وجود قطره‌های چربی در سلول‌های کبدی معمولی است و مقادیر زیاد آن می‌تواند بیانگر جیرهٔ بالانس نشده یا دژنراسیون چربی باشد. تفاوت‌های گزارش شده در دانسیتهٔ الکترونی قطره‌های چربی می‌تواند بیانگر درجات متفاوت متابولیسم داخل سلول چربی باشد (Takashima and Hibiya, 1995).

روده در ماهی‌ها از پیلور شروع و به مخرج ختم می‌شود. مرز روده کوچک و بزرگ گاهی حتی از طریق میکروسکوپی هم به سختی تشخیص داده می‌شود (Lee and Cossins, 1988; Stoskopf, 1993). پوشش مخاطی روده از یک لایه سلول استوانه‌ای تشکیل می‌شود. یک سلول آنتروسیت مشخص، سلولی استوانه‌ای و بلند با هسته بیضی شکل در مرکز یا قاعده می‌باشد. بافت لنفاوی مربوط به روده نیز در ماهی‌ها رشد زیادی ندارد. بافت لنفاوی مربوط به روده و پلاکهای پیر در لامیناپروپریا و زیر مخاط روده تشخیص داده نشده‌اند (Takashima and Hibiya, 1995). نفوذ این سلول‌های لنفی در لامیناپروپریا و زیر مخاط، در دفاع روده نقش اساسی دارد (Suzuki, 1993).

در حالی که بعضی منابع وجود لایه عضلانی مخاطی را در ماهی‌ها نادر می‌دانند (Stoskopf, 1993)، لیکن گاهی آنرا به صورت لایه‌ای با رشد بسیار کم توصیف می‌کنند (Takashima and Hibiya, 1995). آنتروسیت‌های رودهٔ قدامی و خلفی از لحاظ ساختمان تفاوت چندانی ندارند و تفاوت آنها بیشتر از نوع عملکردی است. در ماهی‌های بالغ آنتروسیت‌های رودهٔ قدامی در جذب مواد چربی و پروتئین‌ها فعال هستند و در نتیجه جذب مواد چربی قسمت رأسی آنتروسیت‌های رودهٔ قدامی دارای وزیکول‌های چربی

Archive of SID

www.SID.ir

بزرگی است (Vicentini et al., 2005).

هدف از انجام این مطالعه بررسی بافت شناسی برخی از اعضای داخلی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان که نقش موثری در متابولیسم و فعالیت سیستم ایمنی ماهی به عهده دارند، بوده است. اطلاعات هر چه بیشتر از جزئیات سلولی در سطح میکروسکوپ نوری و الکترونی می‌تواند محققین را در نتیجه‌گیری پیرامون زمینه‌های ذکر شده رهنمون سازد.

مواد و روش‌ها

الف: مطالعه بافت شناسی بوسیله میکروسکوپ نوری

تعداد ۵ ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی سالم، با وزن متوسط ۱۰۰ گرم از منطقه کوهمره سرخی استان فارس تهیه و قسمتی از بافت‌های نرمال کبد، طحال، و روده، جداسازی گردید. نمونه‌ها بعد از سه بار شستشو در محلول سرم فیزیولوژی در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفته و جهت انجام مراحل معمول پایدارسازی و مقطع‌گیری به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل گردید. مقاطع تهیه شده در مرحله بعد جهت مطالعه بافت‌شناسی مورد رنگ‌آمیزی‌های معمول هماتوکسیلین و ائوزین و برای روده مورد رنگ‌آمیزی آلسین بلو و تولوئیدن بلو قرار گرفتند (Sinha and Chakrabarti, 1985).

درروش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین به ترتیب خارج کردن پارافین موجود در مقاطع و آبدهی آنها، قرار دادن اسلایدها در رنگ هماتوکسیلین به مدت ده دقیقه، گذراندن از آب مقطر و متعاقباً قرار دادن در محلول اسیدهیدروکلریک ۱٪ و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، شستشو با جریان ملایم آب به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، قرار دادن در ظرف ائوزین به مدت یک دقیقه، عملیات آبگیری، شفاف سازی و چسباندن انجام گرفت.

روش رنگ‌آمیزی اختصاصی آلسین بلو و تولوئیدن بلو برای نمونهٔ روده شامل خارج کردن پارافین موجود در مقاطع و آبدهی آنها، قرار دادن در محلول رنگ به مدت ۱۰ دقیقه، گذراندن از آب مقطر به منظور شستشوی رنگ‌های اضافی، دیفرانسیه کردن اولیه در آب و متعاقباً دیفرانسیه کردن کامل در الکل و آبگیری، شفاف سازی و چسباندن روی لام بود.

ب: مراحل تهیه مقاطع برای مطالعه در سطح میکروسکوپ الکترونی

برای انتخاب ساختار بافتی مورد نظر جهت مطالعه در سطح میکروسکوپ الکترونی لازم بود در ابتدا مقاطع نیمه نازک بررسی و ساختار مورد نظر شناسایی شود. جهت انجام این کار ابتدا از ارگان‌های مورد نظر مقاطع نیمه نازک تهیه و با تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی و ساختار بافت شناسی مورد مطالعه ابتدایی قرار گرفت، سپس با استفاده از مقاطع بسیار نازک و رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب مقاطع در سطح میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید (Kita and Itazawa, 1994).

الف) جداسازی نمونه: قسمتی از بافت‌های کبد، طحال و روده نرمال ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی فوق الذکر در محلول پایدارکننده به آزمایشگاه بافت شناسی منتقل گردید.

ب) پایدارسازی بافت: نمونه‌های بافتی کبد، طحال و روده به ابعاد ۱×۱×۱ میلی متر مکعب تهیه و در ظروف حاوی گلوتارآلدهید ۴٪ قرار گرفته و پس از دو ساعت این محلول پایدارکننده اولیه خارج و گلوتارآلدئید تازه به نمونه‌ها اضافه شد. در نهایت محلول پایدارکننده خارج گردیده و چهار بار هر بار بمدت نیم ساعت نمونه‌ها با بافر مربوط شستشو داده و سپس به آنها محلول تتراکسید اسمیوم ۲٪ اضافه گردید. تتراکسید اسمیوم علاوه بر خاصیت پایدارسازی قوی موجب رنگ پذیری غشاء لیپوپروتئینی سلول‌ها نیز می‌گردد.

ج) آبگیری: ابتدا برای پاک شدن نمونه‌ها از تتراکسید اسمیوم، آنها را به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر شستشو داده و سپس با اتانول ۷۰ و ۹۵ درصد سه بار و با اتانول ۱۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

درصد یک‌بار هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه از نمونه‌ها آبگیری صورت گرفت.

د) شفاف‌سازی: در این مرحله دو بار به نمونه‌های بافتی اکسید پروپیلن ۱۰۰٪ اضافه شده و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه نمونه‌ها در محلول فوق قرار داده شدند.

ه) نفوذ دادن: در این مرحله مخلوطی از اکسید پروپیلن و رزین مخصوص به میزان مساوی تهیه و به نمونه‌ها اضافه گردید، سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شدند. بعد از این مدت محلول تخلیه شده و رزین خالص به نمونه‌ها اضافه گردید. به منظور نفوذ رزین به داخل بافت‌ها، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه گرداننده قرار داده شدند.

و) قالب‌گیری: در این مرحله قطعات بافتی در ته کپسول‌های پلاستیکی گذاشته و مشخصات نمونه در داخل دیواره قرار داده شده و سپس کپسول‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه قرار گرفتند تا رزین پلیمریزه و سخت گردد.

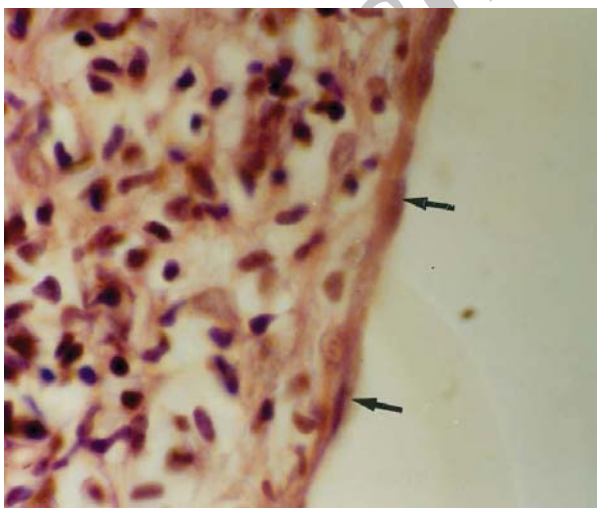
ز) مقطع‌گیری: شامل گرفتن مقاطع نازک به ضخامت ۶۰ نانومتر جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی توسط دستگاه اولترا میکروتوم انجام گرفت. در این مرحله مقاطع نازک بافت‌های نرمال کبد، طحال و روده ماهی روی گریدهای مسی ۱۰۰ مش قرار داده شده و آماده رنگ‌آمیزی گردیدند.

ه) رنگ‌آمیزی مقاطع نازک: برای این رنگ‌آمیزی گریدهای مسی مخصوص از طرفی که مقطع روی آن چسبیده بر روی قطرات استات یورانیل قرار گرفته و روی صفحه مومی گذاشته شدند. بعد از نیم ساعت قطرات سیترات سرب در قسمت دیگر صفحه مومی قرار گرفته، ابتدا گریدها از روی قطره اول با پنس برداشته شده و به دقت با آب مقطر شستشو داده شده و سپس با کاغذ صافی خشک گردیده و بلافاصله روی قطرات سیترات سرب قرار داده شدند. بعد از ۵ دقیقه مجدداً گریدها برداشته شده و با آب مقطر شستشو و پس از خشک نمودن کامل در جعبه‌های مخصوص گذاشته شدند. مقاطع توسط میکروسکوپ الکترونی فیلیپس مدل CM10-TEM مورد بررسی و عکسبرداری قرار گرفتند.

نتایج

مطالعه بافت شناسی در سطح میکروسکوپ نوری:

طحال: بررسی مقاطع پارافین تهیه شده از طحال نشان داد که این عضو از خارج توسط کپسول نازکی از جنس بافت همبند سست احاطه شده و دارای پوشش مزوتلیومی می‌باشد. از کپسول ترابکولاهای متعددی از جنس بافت همبند متراکم ضخیم‌تر به داخل ارگان نفوذ می‌کند (شکل ۱). بافت همبند بینابینی از نوع بافت همبند سست تشخیص داده شد. سلول‌های عضلانی صاف به صورت پراکنده در ساختار چهارچوب این عضو دیده می‌شود. پارانشیم طحال از دو قسمت اصلی پالپ سفید و قرمز تشکیل می‌شود که تراکم ناحیه پالپ سفید به مراتب بیشتر بود.



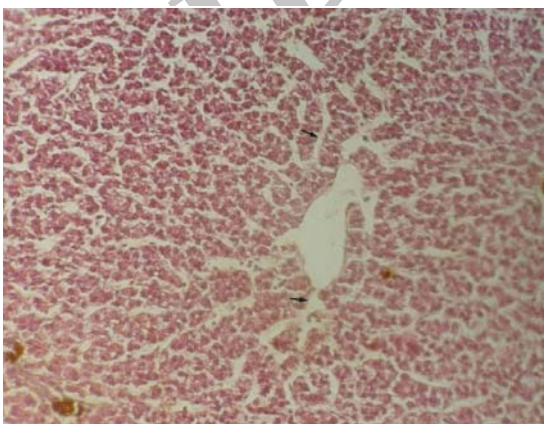
شکل ۱- مقطعی از بافت طحال، وجود کپسول نازک دارای پوشش مزوتلیومی (نوک پیکان‌ها) و بافت همبند سست بینابینی در پارانشیم دیده می‌شوند (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین ۱۰۰۰×).

Archive of SID

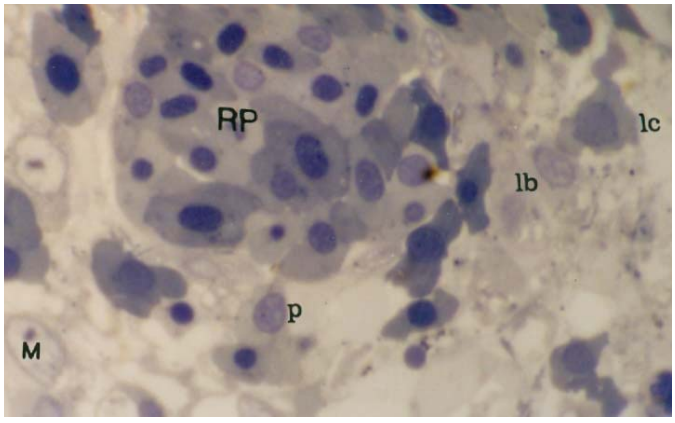
www.SID.ir

خونرسانی ارگان از طریق انشعابات سرخرگ‌های موجود در ترابکولا و سرخرگ‌های مرکزی در پالپ سفید، سرخرگ‌های پنسیلار و سینوزوئیدها در پالپ قرمز انجام می‌گیرد. در ناحیهٔ پالپ سفید تراکم سلول‌های لنفوسیتی شامل لنفوبلاست‌ها، لنفوسیت‌ها و همچنین پلاسماسل‌ها و ماکروفاژها مشاهده گردید (شکل ۲). در مراکز زاینده پالپ‌های سفید مراحل مختلف تقسیمات میتوزی دیده شد. در ناحیهٔ پالپ قرمز تراکم گلبول‌های قرمز در داخل سینوزوئیدها مشاهده گردید.

کبد: چهارچوب این ارگان شامل کپسول نازکی از جنس بافت همبند سست دارای پوشش مزوتلیومی و بافت همبند بین لوبولی کم ضخامت می‌باشد. سلول‌های کبدی به صورت ردیف‌های نامنظم قرار داشته و توسط سینوزوئیدهای کبدی با دیواره نازک از یکدیگر جدا می‌شوند. تجمع سلول‌های کبدی در بعضی نواحی به صورت توده‌ای دیده شد. لوبول‌های کبدی به علت ضخامت کم بافت همبند بین لوبولی، از یکدیگر مجزا نبوده، اما وجود سیاهرگ مرکزی و پورتال تریاد به تفکیک لوبول‌ها از هم کمک می‌کند (شکل ۳).



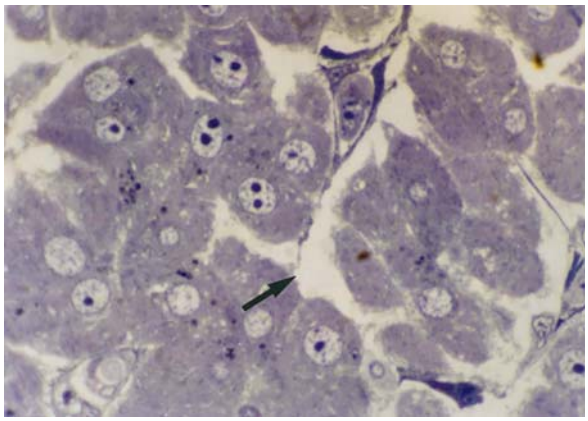
شکل ۳- مقطعی از بافت کبدی، سیاهرگ مرکزی با لومن وسیع و دیواره نازک، سینوزوئیدهای کبدی که در بین طناب‌های سلولی مستقر هستند (نوک پیکان‌ها) بداخل سیاهرگ مرکزی تخلیه می‌شوند مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین ۴۰۰×).



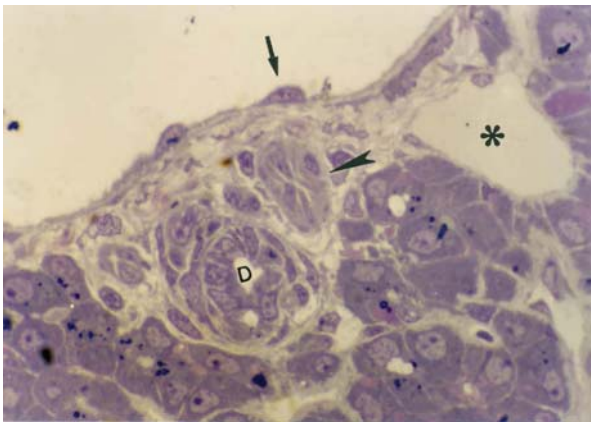
شکل ۲- مقطعی از بافت طحال، سلول‌های تشکیل دهنده پالپ سفید و قرمز در پارانشیم طحال دیده می شوند (سلولهای لنفوبلاست(1b)، لنفوسیت(1c)، پلاسما سل(p)، مزانشیمی(M) و گلبولهای قرمز هسته دار به اشکال مختلف در منطقه پالپ قرمز(RP))(رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو ۲۰۰۰×).

تراکم سلول‌های کبدی در لوبول‌ها به صورت طناب‌های سلولی بوده که توسط سینوزوئیدها از یکدیگر جدا می‌شوند. سیاهرگ‌های مرکزی نسبتاً بزرگ با دیواره نازک حاوی سلول‌های اندوتلیومی دیده شدند. دیواره سینوزوئیدهای کبدی که به داخل سیاهرگ مرکزی تخلیه می‌شوند، حاوی دو نوع سلول مشخص اندوتلیوم و ماکروفاژ می‌باشد. اکثر سلول‌های کبدی دارای یک هسته یوکروماتیک با دو هستک مشخص می‌باشند (شکل ۴). همچنین قطره‌های لیپیدی نیز در اکثر این سلول‌ها دیده می‌شود (شکل ۵).

www.SID.ir



شکل ۴- تراکم سلول‌های کبدی دارای هسته یوکروماتین و دو هستک مشخص همچنین گرانول‌های ترشحی در بعضی از سلول‌ها و کانالیکول‌های صفراوی (نوک پیکان) در بین سلول‌ها دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو ۳۰۰۰×).

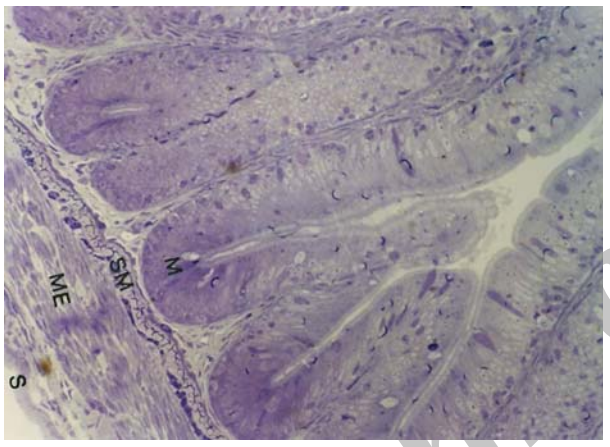


شکل ۵- گرانول‌های ترشحی داخل هپاتوسیت‌ها، مجرای صفراوی(D)، سرخرگ کبدی (سر پیکان) و سیاهرگ بین لوبولی (ستاره) و سلول‌های مزوتلیال روی کپسول کبد دیده می شود (رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو ۱۵۰۰×).

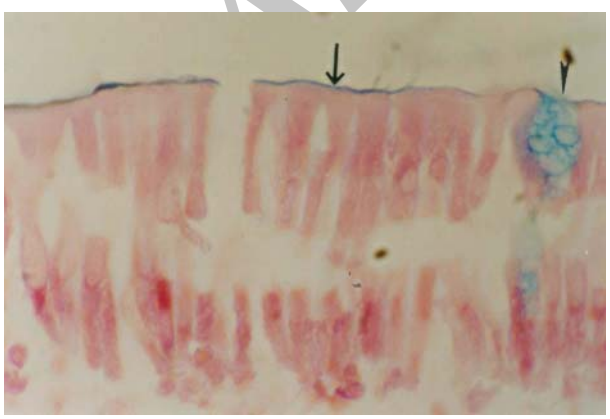
روده قدامی

ساختار روده قدامی در این نوع ماهی به ترتیب از لومن به سمت خارج شامل لایه مخاطی، لایه زیر مخاطی، لایه عضلانی و لایه خارجی سروزی می‌باشد (شکل ۶).

لایه مخاطی و زیر مخاطی تشکیل پرزهای طویل روده را می‌دهند. بافت پوششی از نوع استوانه‌ای ساده و دارای تعداد زیادی میکروویلی در ناحیه رأس سلول است. لایه عضلانی مخاطی نیز در این منطقه دیده شد. در بین سلول‌های بافت پوششی سلول‌های ترشحی گابلت با سیتوپلاسم روشن دیده شدند (شکل ۷). برای تأیید وجود سلول گابلت و میکروویلی از رنگ‌آمیزی اختصاص آلسین بلو در روده استفاده شد که نتایج نشان دهنده وجود هر دو ساختار در بافت پوششی بود. به علت وجود مواد موکوپلی ساکاریدی اسیدی در ترشحات گابلت و پوشش گلیکوکالیکس میکروویلی، ساختار آن در این نوع رنگ‌آمیزی به رنگ آبی فیروزه‌ای دیده شدند. کریپت‌های لیبرکون در روه تشخیص داده شده ولی غدد برونر دیده نشد. لایه پارین در ساختار لایه مخاطی از نوع بافت همبند سست بود.



شکل ۶- مقطع نیمه نازک از بافت روده قدامی، لایه مخاطی(M)، زیر مخاط(SM)، عضلانی(ME) و سروزی(S) دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو ۱۰۰۰×).

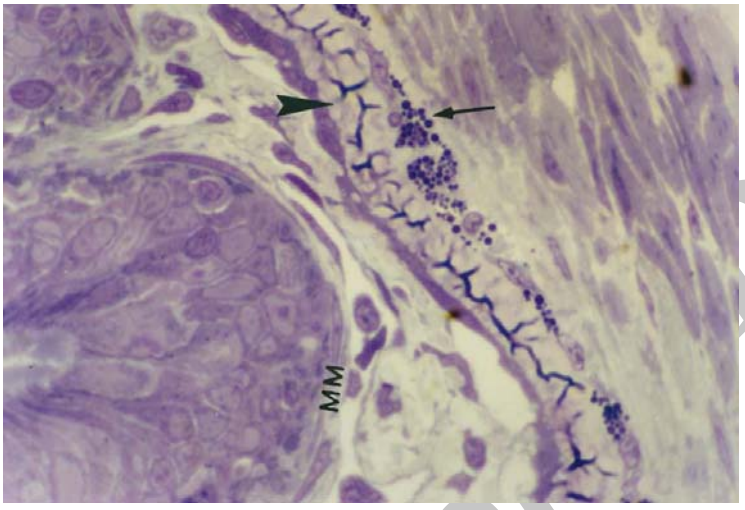


شکل ۷- مقطعی از بافت روده قدامی، سلول ترشحی گابلت (سر پیکان) و میکروویلی (نوک پیکان) را نشان می دهد (رنگ‌آمیزی السین بلو ۱۵۰۰×).

Archive of SID

www.SID.ir

لایه عضلانی مخاطی به صورت یک لایه نازک از سلول‌های عضلانی صاف مشخص بود به علاوه سلول‌های عضلانی صاف به صورت پراکنده به داخل ناحیه پارین نیز وارد می‌شوند. لایه زیر مخاطی از نظر ساختاری شامل تغییراتی از بافت همبند سست تا متراکم بود. لایه عضلانی خارجی شامل لایه‌های حلقوی داخل به صورت ضخیم و طولی خارجی به صورت ظریف می‌باشد. لایه سروزی از بافت همبند سست و یک ردیف سلول‌های پوششی تشکیل شده است (شکل ۸).



شکل ۸- مقطع نیمه نازک از بافت روده قدامی، سلول‌های حاوی گرانول‌های تیره در ناحیه دانه دار زیر مخاط (نوک پیکان) و همچنین لایه همبند متراکم آن (سر پیکان)، لایه عضلانی مخاطی (MM) دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو ۲۰۰۰×).

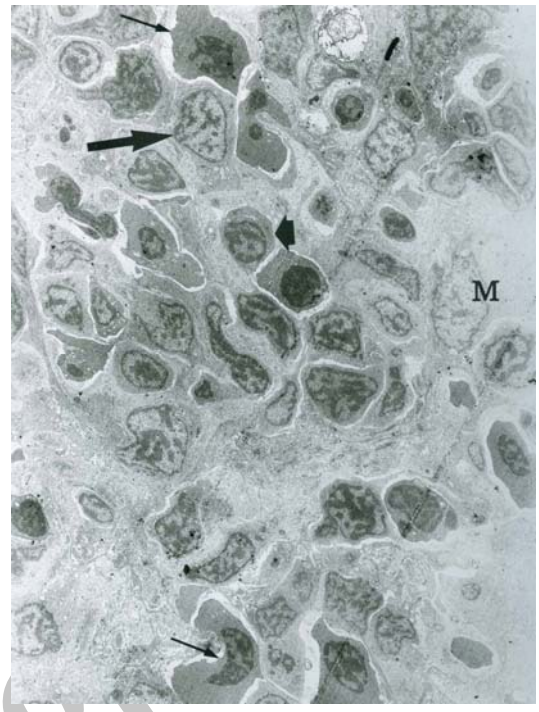
مطالعه بافت شناسی در سطح میکروسکوپ الکترونی

طحال: بررسی مقاطع نیمه نازک ادغام واضح ناحیه پالپ سفید و قرمز را نشان داد، ولی در بعضی از مقاطع این دو ناحیه به صورت تفکیک شده نیز قابل تشخیص بودند. سلول‌های تشکیل دهنده پالپ سفید شامل لنفوبلاست‌ها با هسته بزرگ یوکروماتین، لنفوسیت‌ها با هسته نسبتاً تیره و ماکروفاژها با هسته کلیوی شکل و حاوی ذرات ریزه خواری شده، پلاسماسل‌ها با هسته چرخ درشکه‌ای و همچنین سلول‌های رتیکولار با هسته کشیده نسبتاً روشن تشخیص داده شدند. سلول‌های ماست به تعداد زیادی در همکاری با عروق خونی دیده شدند. حفرات عروق خونی علاوه بر وجود سلول‌های لنفوسیتی حاوی تعداد زیادی گلبول قرمز هسته دار بودند. با بررسی این مقاطع مشخص شد که سیتوپلاسم لنفوسیت‌ها حاوی گرانول‌های ترشحی نسبتاً تیره می باشند. تعداد زیادی سلول مزانشیمی با هسته بزرگ یوکروماتین نیز در سراسر پارانشیم ارگان دیده شدند. در این مقاطع مورفولوژی گلبول‌های قرمز به اشکال مختلف بیضی، کروی، تا دوکی شکل دیده شد. بررسی پارانشیم در سطح میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلول‌های تشکیل دهنده پالپ سفید و قرمز در بررسی بافت شناسی دارای اختلاف می‌باشند. سلول‌های لنفوبلاست با هسته یوکروماتین و لنفوسیت‌ها با هسته تیره‌تر مشاهده شدند. سلول‌های لنفوبلاست علاوه بر شبکه اندوپلاسمی خشن حاوی تعدادی گرانول‌های ترشحی تیره به اشکال مختلف در سیتوپلاسم بودند. علاوه بر سلول‌های لنفوبلاست گرانول‌های ترشحی در سیتوپلاسم لنفوسیت‌ها هم دیده شدند. گلبول‌های قرمز با شکل‌های گوناگون و همگی دارای سیتوپلاسم تیره نسبت به سلول‌های لنفوسیتی در حفره سینوزوئیدهای خونی قابل مشاهده بودند (شکل ۹). سلول‌های مزانشیمی موجود در پارانشیم دارای هسته بزرگ به صورت یوکروماتین تشخیص داده شدند. لنفوسیت‌ها

Archive of SID

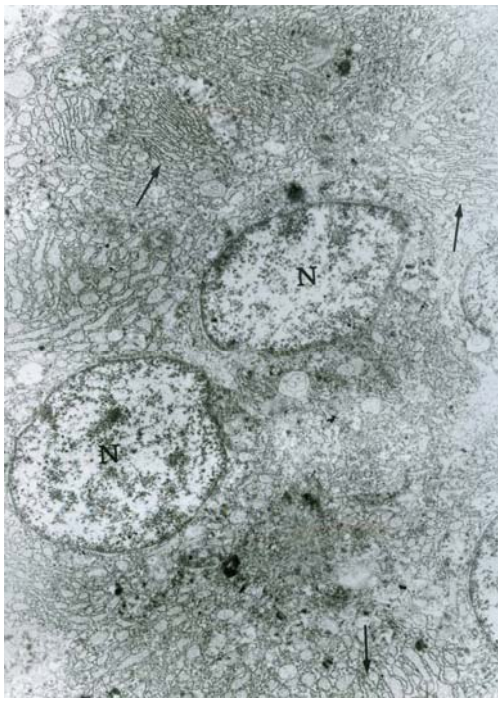
www.SID.ir

توسط زواید سیتوپلاسمی خود در تماس با یکدیگر مشاهده شدند.

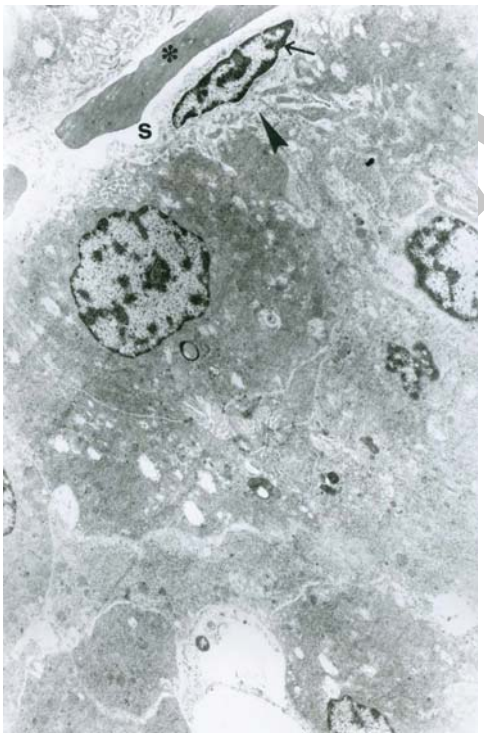


شکل ۹- مقطع نازک از بافت طحال، سلولهای لنفوبلاست (نوک پیکان بزرگ)، لنفوسیت (سر پیکان)، مزانشیمی(M) و گبول‌های قرمز (نوک پیکان‌های کوچک) دیده می‌شوند (رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب۱۵۰۰×).

کبد: بررسی مقاطع کبد در سطح میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلول‌های کبدی به صورت چند وجهی حاوی هستهٔ یوکروماتین و دارای مقدار زیادی شبکهٔ اندوپلاسمی خشن و میتوکندری هستند. علاوه بر این ارگانل‌ها، سیتوپلاسم سلول‌های کبدی حاوی قطرات چربی در اندازه‌های گوناگون و در بعضی از سلول‌ها گرانول‌های ترشحی تیره به اشکال مختلف و حاوی ساختارهای داخلی بودند (شکل ۱۰). سلول‌های کشیدهٔ اندوتلیوم در دیواره سینوزوئیدها توسط فضاهای دیس از سلول‌های کبدی جدا می‌شوند (شکل ۱۱).



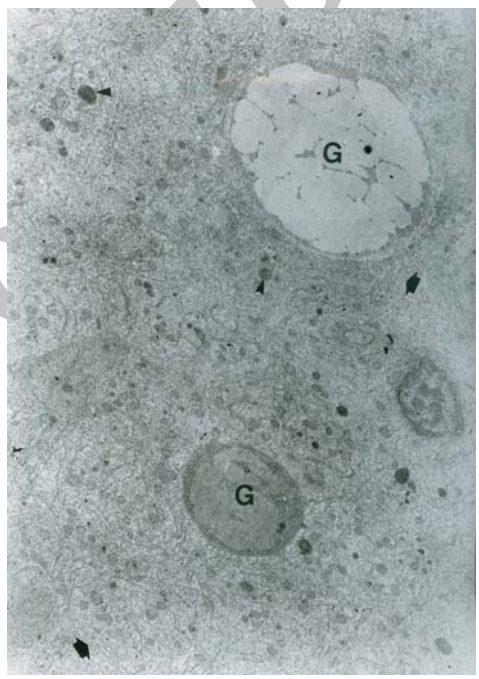
شکل ۱۰- مقطع نازک از بافت کبد، وجود سلول دو هسته‌ای(N) و شبکه اندوپلاسمی خشن فراوان به صورت متسع (پیکان‌ها) مشاهده می‌شوند (رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب۳۹۰۰×).



شکل ۱۱- مقطع نازک از بافت کبد، یک سینوزوئید کبدی(S) حاوی سلول اندوتلیوم (نوک پیکان) و گلبول قرمز(ستاره) و فضای دیس حاوی میکروویلی راًسی هپاتوسیت‌ها (سر پیکان) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب۳۰۰۰×).

www.SID.ir

روده قدامی: سلول‌های جذبی با هسته یوکروماتین و شبکه اندوپلاسمی خشن به همرا میتوکندری و گرانول‌های ترشحی تیره و روشن به اندازه‌های گوناگون دیده شدند. احتمالاً تعدادی از این گرانول‌های ترشحی لیزوزوم هستند. سلول‌های ترشحی حاوی گرانول‌های موکوسی تیره و روشن در سیتوپلاسم در ساختار بافت پوششی دیده شدند (شکل ۱۲). بررسی دیگر مقاطع نفوذ تعدادی سلول دفاعی لنفوسیتی را به داخل بافت پوششی نشان داد که این سلول‌ها نسبت به سلول‌های جذبی دارای سیتوپلاسم و هسته تیره تری بودند.



شکل ۱۲- مقطع نازک از بافت پوششی روده قدامی، شبکه اندوپلاسمی خشن(نوک پیکان‌های ضخیم)، میتوکندری‌ها (سر پیکان‌های کوچک) و دو سلول ترشحی گابلت (G) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی استات یورانیل و سیترات سرب۳۰۰۰×).

بـحث

طحال: بررسی مقاطع پارافین و نیمه نازک طحال، نشان داد که در ساختار این عضو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در بعضی نواحی پالپ‌های سفید و قرمز به صورت ادغام شده و در نواحی دیگر به صورت مجزا و تفکیک شده وجود داشتند. در این نمونه تراکم پالپ‌های سفید بیشتر بوده که این امر در پستانداران از مشخصات سنین پایین است. مطالعات قبلی نشان داده است که در طحال ماهی مرز پالپ‌های سفید و قرمز طحال مشخص نمی‌باشد (Takashima and Hibiya, 1995). طحال به عنوان یک فیلتر خونی عمل کرده و ماکروفاژهای پالپ قرمز آن مواد خارجی و گلبول‌های قرمز پیر و تغییر شکل یافته را به دام می‌اندازند. در ناحیه پالپ سفید تراکم لنفوبلاست‌ها، لنفوسیت‌ها، پلاسماسل‌ها و ماکروفاژها دیده شد. سلول‌های خونساز اصلی از جمله اریتروبلاست‌ها، اریتروسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها، ترومبوسیت‌ها و تعداد معدودی نوتروفیل بالغ و نابالغ، ائوزینوفیل و پلاسماسل در طحال ماهی باس راه راه مشاهده شده است (Bodammer et al., 1990). بررسی مقاطع نیمه نازک طحال وجود گرانول‌های ترشحی نسبتاً تیره در سیتوپلاسم سلول‌های لنفوسیتی را نشان داد که احتمالاً می‌تواند نشان دهندهٔ یک فاز انتقالی از تبدیل لنفوسیت‌ها به پلاسماسل باشد. وجود این گرانول‌های ترشحی می‌تواند بیانگر فعالیت ترشحی لنفوسیت‌ها و تبدیل آنها به پلاسماسل در اثر برخورد با آنتی‌ژن خاص و فعال شدن کلون لنفوسیتی خاص آن باشد.

در بررسی مقاطع نازک طحال در سطح میکروسکوپ الکترونی، سلول‌های تشکیل دهنده پالپ سفید و قرمز مورد مطالعه‌ی دقیق تر قرار گرفتند. گلبول‌های قرمز و سفید از جمله لنفوبلاست‌ها، لنفوسیت‌ها، پلاسماسل و همچنین سلول‌های مزانشیمی تشخیص داده شدند. در بعضی منابع وجود نوتروفیل و ائوزینوفیل به صورت بالغ و نابالغ در پارانشیم طحال ماهی گزارش شده است (Kita and Itazawa, 1994). وجود شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن فراوان در سلول‌های لنفوسیت حاکی از فعالیت شدید سنتزی و پروتئین سازی در این سلول‌ها می‌باشد. وجود گرانول‌های ترشحی تیره در لنفوبلاست‌ها می‌تواند مبین کسب خاصیت بلوغ و تبدیل شدن به لنفوسیت و پلاسماسل که سلول‌های مؤثر سیستم ایمنی هستند، باشد. از آنجا که طحال یک ارگان لنفی ثانویه است، لنفوسیت‌های نابالغ پس از ورود به آن و مواجهه با آنتی ژن، بلوغ نهایی را کسب می‌کنند. در

Archive of SID

www.SID.ir

این حالت این سلول‌ها به سلولهای T فعال یا پلاسماسل تبدیل می‌شوند. لنفوسیت‌های حاوی گرانول‌های ترشحی می‌توانند نشانگر یک مرحله‌ی گذرا از تبدیل لنفوسیت به پلاسماسل یا سلول T فعال شده باشند. سلول‌های مزانشیمی بزرگ با هسته‌ی یوکروماتین وظیفه‌ی تولید سلول‌های پارانشیمی بافت طحال و ایجاد یک چهارچوب برای ساختار ارگان را به عهده دارند.

کبد: چهارچوب کبد شامل کپسول نازکی از جنس بافت همبند سست تشخیص داده شد که انشعاباتی به داخل پارانشیم ارگان می‌فرستد ولی به علت ضخامت کم، لوبول‌های کبدی کاملاً مشخص و مجزا نمی‌باشند. بعضی منابع این امر را به گونه‌ی ماهی ارتباط می‌دهند (Brusle and Anadon, 1996)، در حالی که بعضی دیگر ساختمان لوبولی کبد را مشابه سایر مهره‌داران توصیف می‌کنند (Stoskopf, 1993). در تحقیق حاضر سلول‌های کبدی ماهی حاوی یک یا دو هسته با دو هستک مشخص دیده شدند. بعضی محققین اغلب سلول‌های کبدی را حاوی یک هستک عنوان کرده‌اند (Moon et al., 1985). سیتوپلاسم اسیدوفیلیک سلول‌های کبدی در این مطالعه نشان دهنده فعالیت سنتزی و ترشحی آنها و در نتیجه وجود بسته بندی‌های پروتئینی است.

در بررسی مقاطع نیمه نازک، سلول‌های کبدی به صورت ردیف‌های نامنظم که در بعضی نواحی تشکیل اجتماعات سلولی را داده بودند مشاهده شد. سیتوپلاسم سلول‌های کبدی اکثراً حاوی گرانول‌های تیره و واکوئل‌های روشن بود. سیتوپلاسم این سلول‌ها اغلب حاوی مقادیر قابل توجهی گنجیدگی های لیپیدوگلیکوژن می‌باشد. از آنجا که اصلی‌ترین ماده‌ی ذخیره‌ای در کبد ماهی گلیکوژن و پس از آن چربی است (Takashima and Hibiya, 1995)، این گرانول‌ها و واکوئل‌ها به احتمال زیاد حاوی گلیکوژن و چربی بوده که معمولاً مقادیر زیاد چربی در هپاتوسیت‌ها در اثر تغذیهٔ دستی با جیره‌ی بالانس نشده و افزایش نسبت چربی به پروتئین می‌باشد. در بررسی دقیق‌تر، دانه‌های گلیکوژن به صورت ذرات با حاشیه‌ی نامنظم و قطره‌های چربی به صورت کروی با مرز منظم به صورت تکی یا مجتمع دیده شدند. تشخیص دقیق گلیکوژن و میزان آن در سلول نیازمند رنگ‌آمیزی خاص یا بررسی در سطح میکروسکوپ الکترونی است.

در نواحی پورتال تریاد دیوارهٔ مجرای صفراوی شامل یک ردیف سلول مکعبی، دیوارهٔ شاخهٔ سرخرگ کبدی شامل لایهٔ اندوتلیوم و یک تا دو ردیف سلول عضلانی صاف و دیواره‌ی سیاهرگ بین لوبولی با لومن گشاد به صورت یک ردیف سلول اندوتلیوم با لایه‌ی نازکی از عضلهٔ صاف مشاهده شد. بعضی منابع وجود مراکز ملانوماکروفاژی در کبد ماهیان را در اثر بروز یک پاسخ التهابی عنوان کرده‌اند (Stoskopf, 1993) لیکن در این مطالعه که بر روی ماهی‌های قزل‌آلای کاملاً سالم انجام گرفت، چنین ساختاری مشاهده نگردید.

در بررسی مقاطع نازک کبد در سطح میکروسکوپ الکترونی، سلول‌های کبدی دارای هسته یوکروماتین و حاوی مقادیر زیادی شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن و میتوکندری مشاهده شدند که نشانگر فعالیت شدید سنتزی در غالب وظایف مهم و متعدد سلول‌های کبدی می‌باشد. طرح داخلی و ارگانل‌های خاص هپاتوسیت‌ها در ماهی‌های مختلف براساس سن، جنس، فصل، زمان تخم‌ریزی و نوع تغذیه متفاوت است. جهت قرار گرفتن شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن در سلول با جهت سلول ارتباط واضحی ندارد، ولی گه‌گاه تیغه‌های آن موازی با غشاء سلول قرار می‌گیرند. شبکه‌ی اندوپلاسمی صاف معمولاً کم بوده و در اطراف ذخایر گلیکوژنی یا در بین فضاهای دستگاه گلژی قرار می‌گیرند (Takashima and Hibiya, 1995). وجود قطرات چربی در سلول‌های کبدی یافتهٔ معمولی است و مقادیر زیاد آن می‌تواند بیانگر جیره‌ی بالانس نشده یا دژنراسیون چربی باشد. تفاوت‌های گزارش شده در دانسیته‌ی الکترونی قطرات چربی می‌تواند بیانگر درجات متفاوت متابولیسم داخل سلول چربی باشد (Moon et al., 1985).

روده قدامی: ساختار روده قدامی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شامل چهار لایهٔ اصلی مخاط، زیر مخاط،

Archive of SID

www.SID.ir

عضلانی و سروزی است. لایه‌ی مخاطی و زیر مخاطی تشکیل پرزهای طویل روده را می‌دهند. لایهٔ عضلانی مخاطی در رودهٔ قدامی ماهی قزل‌آلا به خوبی نمایان بود در حالی که بعضی منابع وجود این لایه عضلانی مخاطی را در ماهی‌ها نادر می‌داند و گاهی آن را به صورت لایه‌ای با رشد بسیار کم توصیف می‌کنند (Takashima and Hibiya, 1995).

در بررسی حاضر لایه مخاطی شامل سلول‌های استوانه‌ای بلند که با رنگ‌آمیزی آلسین بلو به خوبی نمایان بود و در بین سلول‌های بافت پوششی سلول‌های گابلت به تعداد زیاد با سیتوپلاسم روشن مشاهده شدند. کریپت‌های لیبرکن که مسئول ترشح موکوس و تولید سلول‌های اپی تلیال هستند در لامیناپروپریای روده‌ی قدامی تشخیص داده شدند در حالی که بعضی محققین معتقدند کریپت‌های لیبرکون تنها در ماهی کاد دیده می‌شود (Stoskopf, 1993).

غدد برونر در زیر مخاط تشخیص داده نشدند. بافت لنفاوی همراه روده و پلاک‌های پیر در لامیناپروپریا و زیر مخاط روده تشخیص داده نشدند (Takashima and Hibiya, 1995) اما نفوذ سلول‌های لنفی به صورت منتشر در لامیناپروپریا دیده شد. نفوذ این سلول‌های لنفی در لامیناپروپریا و زیر مخاط، در دفاع روده نقش اساسی دارد (Sinha and Chakrabarti, 1985). با توجه به گوشتخوار بودن ماهی قزل‌آلای رنگین کمان احتمال می‌رود که لایه متراکم زیر مخاط مانند لایه‌ی زیر غده‌ای در روده گوشتخواران عمل حفاظتی به عهده داشته باشد. در لایه دانه‌دار زیر مخاط تعداد زیادی سلول حاوی گرانول‌های ترشحی دیده شدند که احتمالاً نامگذاری این لایه بعلت حضور این سلول‌ها می‌باشد. بعضی محققین معتقدند که معمولاً گونه‌هایی از ماهی‌ها که دارای لایه‌ی ماهیچه مخاطی هستند فاقد لایه‌های متراکم و دانه‌دار در زیر مخاط خود می‌باشند (Takashima and Hibiya, 1995)، که در بررسی حاضر هم لایه ماهیچه مخاطی و هم لایه‌های متراکم و دانه دار دیده شد.

یک آنتروسیت روده قدامی دارای هسته‌ی یوکروماتین که در اطراف آن شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن دیده می‌شود. میزان شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن از صاف بیشتر می‌باشد و غشاهای آن اغلب در جهت محور طولی سلول قرار می‌گیرند. غشاء جانبی سلول‌های مجاور اتصالات بین سلولی کمی داشته و دسموزوم‌ها به صورت نادر یافت می‌شوند. این سلول‌ها در سطح شبکه انتهایی توسط مجموعه‌ای از اتصالات مسدود بهم متصل می‌شوند (Jenkins et al., 1992). ساختارهای تیغه‌ای اندوپلاسمی در زیر هسته احتمالاً در تنظیم میزان آب و نمک نقش دارند (Mir and Channa, 2010; Suzuki, 1993). بررسی مقاطع نازک نشان داد که آنتروسیت‌های روده قدامی دارای شبکه اندوپلاسمی خشن می‌باشند که به علت عملکرد بیشتر آنها در جذب مواد چربی و پروتئینی است.

منابع

- Amin, A.B., Mortensen, L. & Poppe, T. (1992). *Histology Atlas, normal structure of salmonids.* International edition. Norway: Akvapathologisk Laboratorium.
- Bodammer, G.E., Anderson, D.P. & Dixon, O.M. (1990). Ultrastructure of the spleen and head kidney of striped bass. *Journal of Aquatic Animal Health* **2**: 182-193.
- Brusle, J. & Anadon, G. G. (1996). The Structure and Function of Fish Liver. In *Fish Morphology,* (Munshi, J.S.D. & Dutta, H.M., eds), pp. 77-93. New Hampshire: Science Publishers.
- Jenkins, P.G., Pulsford, A.L. & Harris, J.E. (1992). Microscopy of the absorptive cells and gut-associated lymphoid tissue of the flounder *Platichthys flesus*. *Journal of the Marine Biology Association of the United Kingdom* **72**: 553-567.
- Kita, J. & Itazawa, Y. (1994). Scanning electron microscope study of rainbow trout spleen with special reference to the role of the reticular meshwork in erythrocyte release. *Japanese Journal of Ichthyology* **41**: 287-293.
- Lee, J.A.C. & Cossins, A.R. (1988). Adaptation of intestinal morphology in the temperature-acclimated carp, *Cyprinus carpio*, L. *Cell and Tissue Research* **251**: 451-456.

Archive of SID

www.SID.ir

- Stoskopf, M.K. (1993). *Fish medicine*. Philadelphia: W.B Saunders.
- Suzuki, N. (1993). Electron microscopic study on intestinal epithelium of marine teleost *Acanthogobius flavimanus* with reference to the adaptive functions. *Bulletin of the Nanset Fish Research Institute* **26**: 113-132.
- Takashima, F. & Hibiya, T. (1995). *An atlas of fish histology*, 2nd edn. Tokyo: Kodansha Ltd.
- Vicentini, C. A., Franceschini-Vicentini, I. B., Bombonato, M. T. S., Bertolucci, B., Lima S. G. & Santos, A. S. (2005). Morphological Study of the Liver in the Teleost *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Morphology* **23**: 211-216.
- Mir I.H. & Channa, A. (2010). A scanning electron microscopic examination of the intestinal tract of the snow trout, *Schizothorax curvifrons*. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **5**: 386-393.
- Moon, T.W., Walsh, P.J. & Mommsen, T.P. (1985). Fish hepatocytes: a model metabolic system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**: 1772-1782.
- Sinha, G.M. & Chakrabarti, P. (1985). On topological characteristics of the mucosal surface in *Buccopharynx* and intestine of an Indian freshwater major carp, *Catla catla* (Ham.): A light and scanning electron microscopic study. *Zoologische Jahrbucher Anatomie* **113**: 375-389.

Archive of SID

www.SID.ir

Histological study of spleen, liver and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Z. M. Siavosh Haghighi[1], M. Akhlaghi*[2], H. Mansouri[2]

Abstract

In this study, histology of some of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) internal organs involved in fish metabolism and immune system was studied. To do this, spleen, liver and anterior intestine of rainbow trout were examined using light and electron microscopy. Results showed that spleen is covered by a loose connective tissues consisting of mesothelial cells. Spleen paranchyma is divided in two white and red pulps in which the white pulp is dominated. Mesenchymal cells have large chromatic nucleus. Lymphocytes are related to each other by their cytoplasmic processes. Liver has a mesothelial cell layer externally. liver cells in lobules are irregularly arranged in rows and the lobules are separated by sinusoids. Liver cells with two nucleus, rough endoplasmic reticulum and bile ducts with diverse sized microvilli are observed. Anterior intestine sections revealed mucosal layer muscular layer, goblet cells and microvilli. Mucosal cells in the anterior intestine contain abundant rough endoplasmic network and mitochondria.

Keywords: Histology, Spleen, Liver, Intestine, Rainbow trout, Light microscopy, electron microscopy

Archive of SID

1. School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
2. School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
* E-mail: akhlaghi@shirazu.ac.ir

www.SID.ir