

مطالعه هیستومرفومتریک، هیستوشیمی و الکترون میکروسکوپی سلول‌های جامی نواحی مختلف اپیدرم میس 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 جامی شکل ترشح می‌شود و عمدتاً شامل موسین و دیگر گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد. هدف: مطالعه هیستومرفومتریک، هیستوشیمی و الکترون میکروسکوپی سلول‌های جامی نواحی مختلف اپیدرم میس ماهی. روش کار: در این پژوهش تعداد ۶ عدد میس ماهی مورد استفاده قرار گرفت و برای انجام مطالعات میکروسکوپی از ناحیه پشتی برش‌هایی به ضخامت $0.5 \mu\text{m}$ تهیه و مورد رنگ آمیزی AB، PAS، H&E (PH=۲) و AB-PAS (PH=۲) قرار گرفتند. برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی پس از ثبوت اولیه و ثانویه و آبیگری در داخل رزین آغشته گردیده و پس از تهیه برش‌های فوق نازک 50 nm در داخل یورانیل استات رنگ آمیزی گردیدند. نتایج: میس ماهی در نواحی شکمی و پشتی دارای بیشترین و در نواحی دم دارای کمترین تعداد سلول موکوسی جامی شکل در $100 \mu\text{m}$ 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 یا PH=۲ 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 میس ماهی وجود داشته و دارای ماهیت موکوسی یکسانی است.

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

مقدمه

Cellules و Calciformes، Keleinsten sheleimzellen، سلول‌های muqueuses of mucipares نام‌های متفاوتی می‌باشند که توسط محققین مختلف به سلول‌های مذکور نسبت داده شده است (۱۲، ۵). برخی از ماهیان این سلول‌ها چند نوع گلیکوپروتئین تولید می‌کنند و ترکیب شیمیایی موکوس تولید شده در اثر دگر دپسی 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 چین خوردگی 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

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 کربنوتوکسین‌ها، کالمدولین‌ها، فرمون‌ها و انواعی از مواد ضد عوامل بیماری‌زا مانند ایمونوگلوبولین‌ها، اجزای کمپلمان، لیزوزیم، آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین، لکتین‌ها و سایر پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی است (۹، ۶، ۲). موکوس کاهنده اصطکاک است و به ماهی کمک می‌کند تا با سرعت بیش تر و صرف انرژی کم تر به حرکت خود ادامه دهد (۱۲). سلول‌های جامی شکل ترشح کننده موکوس، غددی تک سلولی است که با ترشحات برون ریز خود، پوشش لزج سطح بدن ماهیان را به وجود می‌آورند (۲۲). سلول‌های جامی شکل در برخی از ماهیان به صورت دستجاتی در نواحی مختلف بدن تجمع می‌یابند و غدد هولو کرین 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 رنگ آمیزی PAS و آلکالین آبی واکنش مثبت نشان می‌دهد (۲۱). سلول‌های جامی شکل ترشح کننده موکوس، سلول‌های موکوسی خنثی، سلول‌های اصلی ترشح کننده موکوس، سلول Becherzellen، سلول



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

ناحیه سر	Mean \pm SD
۲/۷۳ \pm ۰/۲۴	
ناحیه شکمی	Mean \pm SD
۳/۰۱ \pm ۰/۲۶	
ناحیه پشتی	Mean \pm SD
۳ \pm ۰/۱۹	
ناحیه دم	Mean \pm SD
۷/۴۵ \pm ۰/۱۶	

در هر برش حداقل پنج میدان دید میکروسکوپی با عدسی شیئی $\times 10$ و در طول $100 \mu\text{m}$ 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 رنگ آمیزی پرپودییک 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 گلو تار آلدئید 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 گلو تار آلدئید ۴٪، با استفاده از 0.1 M sodium cacodylate buffer، در ۳ مرحله و هر مرحله به مدت ۱۵ دقیقه شستشو شدند. در ادامه برای ثبوت ثانویه نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در تتراکسید از میوم Osmium Tetroxide ۱٪ قرار گرفتند و سپس برای شستشو مجدداً با استفاده از 0.1 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 افزایشنده 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 ۱ به ۱ هر دو ماده به مدت ۲۴ ساعت، ۳ حجم رزین به همراه یک 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 60°C تا 70°C قرار داده شدند و در نهایت جهت تهیه برش از دستگاه اولترامیکروتوم برش‌هایی به ضخامت 50 nm از نمونه‌ها تهیه شد و برای رنگ آمیزی برش‌های فوق نازک از استات یورانیل استفاده گردید و در نهایت از برش‌های تهیه شده توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی Zeiss-EM10C - KV 80 ساخت کشور آلمان عکس برداری شد.

حضور ایمونوگلوبولین در سلول‌های جامی شکل 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 بیش تری از سلول‌های پوششی لایه‌های پایین تر اپیدرم تمایز حاصل کنند و با تولید موکوس بیش تر، موجب افزایش مکانیسم دفاعی شوند. عوامل استرس‌زا مانند دست کاری یک ماهی می‌تواند باعث افزایش تعداد سلول‌های جامی شکل 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 جامی شکل 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 $14/83 \pm 0/816 \text{ kg}$ و میانگین طول $114/16 \pm 4/08 \text{ cm}$ 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 5 mm تهیه و در فرمالین بافر ۱۰٪ فیکس و جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی 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)، پرپودییک اسید شیف (PAS) Alcian Blue (۲/۵ = PH) و Alcian Blue (۲/۵ = PH) قرار گرفته و مطالعات هیستولوژی، هیستومتریک و هیستوشیمی روی آن‌ها انجام گردید. در مطالعات هیستومتریک تعداد سلول‌های جامی شکل 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

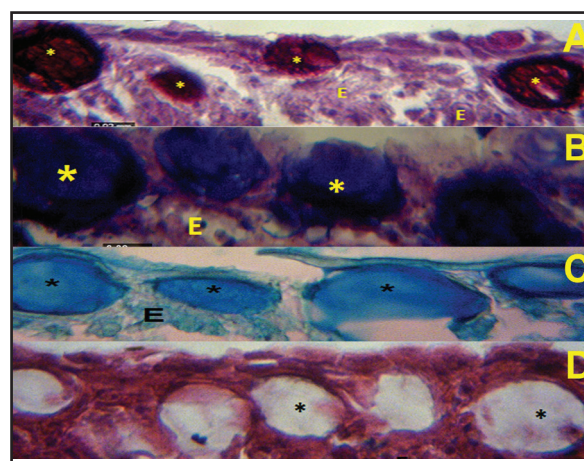


جدول ۲. مقایسه تعداد سلول‌های جامی شکل نواحی مختلف پوست میس ماهی در طول ۱۰۰ μm از اپیدرم (p<۰/۰۵).

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

این سلول‌ها در رنگ آمیزی (PAS-۲/۵ = AB, PH) همزمان رنگ آبی و ارغوانی را به خود گرفتند و بنفش شدند (تصویر ۱). 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 میس ماهی در ۱۰۰ μm 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 سلول‌ها در ناحیه سر ۲/۳۳ عدد سلول در ۱۰۰ μm 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 جامی شکل، ناحیه دم میس ماهی در مقایسه با نواحی سر، شکمی و پشتی میس 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 (تصویر ۲ 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 A و B). سلول‌های مذکور ترشحات موکوسی خود را بر روی میکروویج‌های سطحی حاصل از بیرون‌زدگی‌های متوالی غشاء بیرونی سلول‌های سنگفرشی سطحی اپیدرم می‌ریزند. میکروویج‌های سلول‌های سنگفرشی با ایجاد برآمدگی‌های متوالی بر روی غشاء سلول‌های سنگفرشی سبب

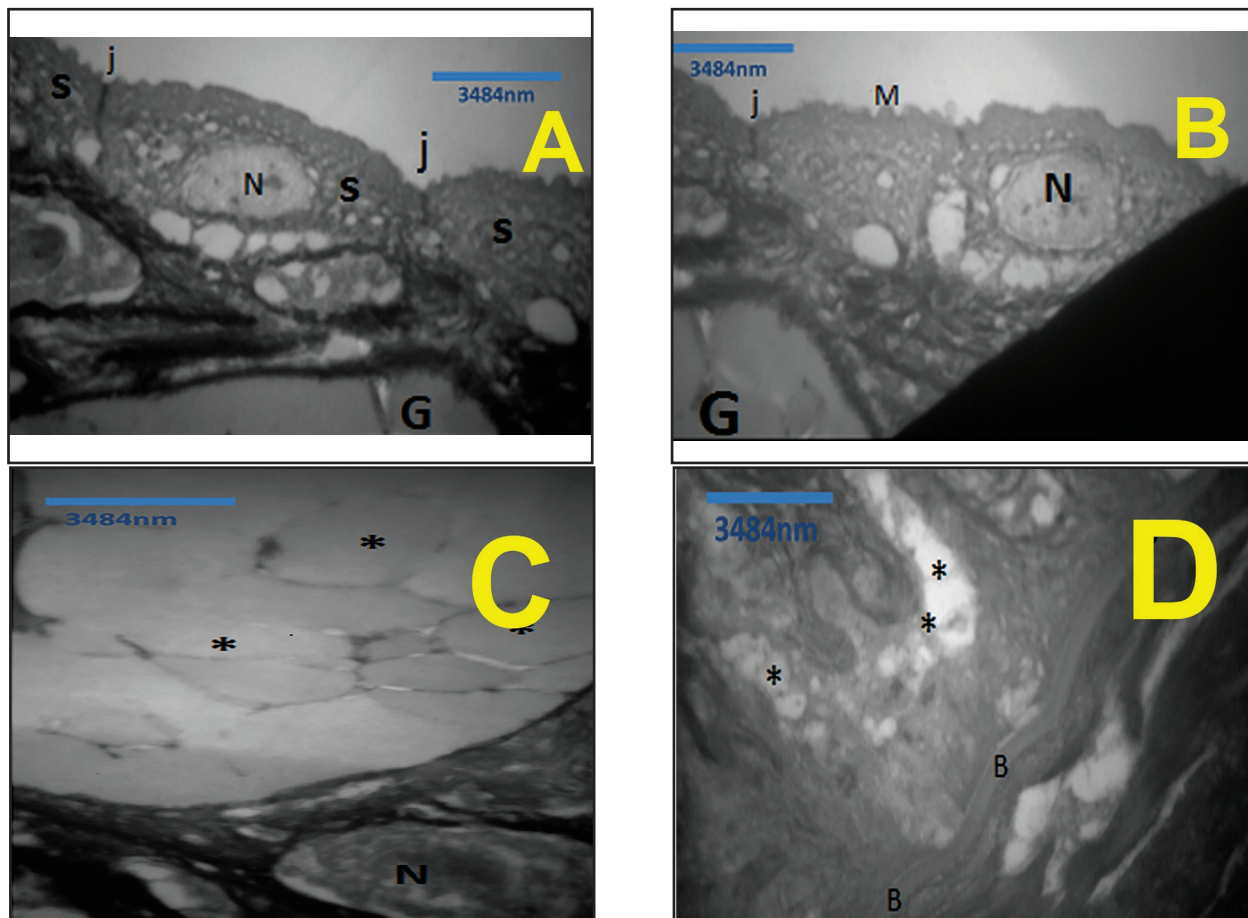


تصویر ۱. اپیدرم نواحی مختلف میس ماهی (H&E, ۴۰×). سلول‌های جامی (*) در میان سلول‌های پوششی اپیدرم (E). بخش A: رنگ آمیزی PAS. بخش B: رنگ آمیزی PAS-AB (PH=۲/۵). بخش C: رنگ آمیزی PAS-AB (PH=۲/۵). بخش D: رنگ آمیزی H&E.

نتایج

در مشاهدات میکروسکوپی و نتایج هیستولوژی مشخص گردید که اپیدرم تمام نواحی پوست میس ماهی شامل سلول‌های جامی شکل و دیگر سلول‌های پوششی می‌باشد. حد فاصل سلول‌های جامی شکل سلول‌های پوششی قرار می‌گیرند. سلول‌های جامی شکل اپیدرم شبیه یک جام بوده و به راحتی از سایر سلول‌های اپیدرمی قابل تشخیص و شناسایی می‌باشند. در رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین محتویات موکوسی داخل سیتوپلاسم سلول‌های جامی توسط الکل و گزیرول شسته شده و رنگی به خود نگرفتند (تصویر ۱). نتایج هیستوشیمی نشان داد که محتویات موکوسی سلول‌های مذکور در اپیدرم تمام نواحی نمونه برداری شده از پوست بدن میس ماهی حاوی گلیکوژن و گلیکوپروتئین با PH خنثی و قابل اکسیداسیون است و به رنگ PAS به شدت واکنش نشان داد و رنگ ارغوانی به خود گرفتند (تصویر ۱). همچنین در اپیدرم تمام نواحی نمونه برداری شده از پوست بدن میس ماهی، محتویات موکوسی سلول‌های مذکور به رنگ آمیزی (PAS, PH=۲/۵) نیز واکنش مثبت نشان داده و رنگ آبی به خود گرفتند. در این رنگ آمیزی سلول‌های موکوسی جامی شکل نواحی مختلف پوست بدن میس ماهی حاوی موسین اسیدی (دارای موسین‌های با اسید سیالیکی حاوی گلیکوپروتئین سولفات‌ها و کربوکسیله غیر سولفات‌ها) بوده و رنگ آبی به خود گرفتند (تصویر ۱). به همین دلیل





تصویر ۲. میکروگراف الکترونی عبوری از نواحی پشتی اپیدرم میس 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).

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 ترشح‌کننده 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 ترشح‌کننده موکوس دستخوش تغییرات مشخصی در دوره‌های متوالی تخم‌ریزی می‌شود. در طول زمان تخم‌ریزی کاهش شدیدی در غلظت سلول‌های ترشح‌کننده موکوس اپیدرم مشاهده می‌شود و دلیل این تغییرات احتمالاً بستگی به فاکتورهای هورمونی دارد (۱۴). Pickering در سال ۱۹۷۳ با مطالعه بر روی دو گونه ماهی سالمون گزارش داد که سلول‌های موکوسی دارای یک الگوی

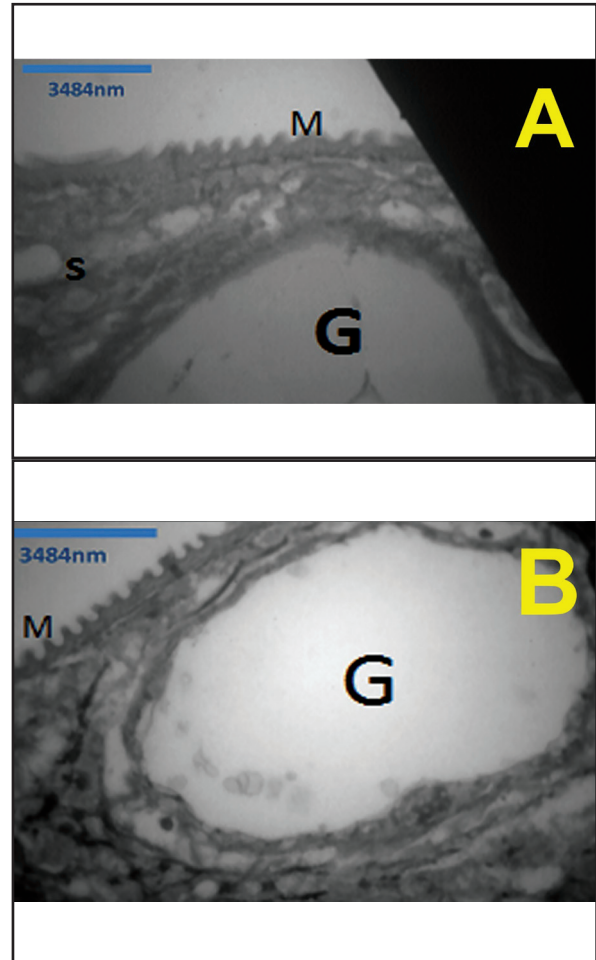
چسبندگی موکوس ترشح‌شده از سلول‌های جامی به پوست بدن میس ماهی می‌شوند (تصویر ۳ بخش A). ترشحات سلول‌های جامی هولوکربینی بوده و با مرگ سلول همراه است (تصویر ۳ بخش B).

بحث

Fletcher و Burton در سال ۱۹۸۳ تغییرات شدیدی در تعداد سلول‌های ترشح‌کننده 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 ترشح‌کننده 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 قزل‌آلای قهوه‌ای مشاهده نمود و بیان کرد تعداد سلول‌های ترشح‌کننده موکوس دستخوش تغییرات مشخصی در دوره‌های متوالی تخم‌ریزی می‌گردد و در طول زمان تخم‌ریزی کاهش شدیدی در غلظت سلول‌های ترشح‌کننده موکوس



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 جامی شکل به هر سه رنگ آمیزی واکنش مثبت نشان دادند زیرا به نسبت‌های مختلف دارای موسین حاوی گلیکوپروتئین با گروه سولفات و موسین حاوی گلیکوپروتئین با گروه کربوکسیله یا غیرسولفات 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 گریزی شکل فاقد این ترکیبات بودند (۱). Kulshrestha و Saxena 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 جامی شکل که حاوی موکوس خنثی و مقاوم به پیوند با ترکیبات سولفات، گلیکوژن و اسید سیالیکی سرشار از گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد و نوع دوم سلول‌های موکوسی هشدار دهنده که حاوی مقدار بسیار کمی موکوس خنثی و سولفات و فاقد گلیکوپروتئین‌ها است. سلول‌های موکوسی جامی شکل به شدت به رنگ آمیزی PAS واکنش مثبت نشان می‌دهند در حالی که سلول‌های موکوسی هشدار دهنده واکنش کمی به این رنگ آمیزی نشان می‌دهند. همچنین هر دو سلول مذکور به رنگ آمیزی (PH=۲/۵=AB) واکنش مثبت نشان می‌دهند (۱۹). میش ماهی در اپیدرم تمام نواحی خود فاقد سلول‌های هشدار دهنده گریزی 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 گلیکوپروتئین با PH خنثی و قابل اکسیداسیون و موسین اسیدی (دارای موسین‌های با اسید سیالیکی حاوی گلیکوپروتئین سولفات و کربوکسیله غیرسولفات) بر عهده دارند. Stoskopf بیان کرد سلول‌های جامی شکل 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 جامی شکل 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



تصویر ۳. 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 برخوردار 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. Mittal و Pinky در سال ۲۰۰۸ جهت مطالعه هیستوشیمی گلیکوپروتئین‌های سلول‌های اپیدرمی ناحیه لب ماهی *Garra lamta* از رنگ آمیزی عمومی H&E و رنگ آمیزی‌های



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](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. New York, 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. Kawewat, 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](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*

است. سلول‌های جامی نابالغ که در نزدیکی لایه بازال قرار دارند قطرات موکوس را در غشاء گلژی ایجاد و ذخیره می‌کنند. همچنین تصاویر آن‌ها نشان 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 هولوکربینی خود را به سطح اپیدرم می‌ریزند (۳). تصاویر بدست آمده از سلول‌های جامی شکل اپیدرم پوست بدن میس ماهی با یافته‌های Brown and Wellings کاملاً مطابقت داشت. 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 سلول‌های موکوسی جامی شکل در تمام نواحی اپیدرم میس ماهی وجود داشته و این سلول‌ها دارای ماهیت موکوسی یکسانی در نواحی مذکور می‌باشند.

تشکر و قدردانی

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

- 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. 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 mucosal 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-



- 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. Whittar, M. (1986) The skin of fishes including cyclostoms 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.



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 0.5 μ 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 μ m 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 μ m 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

Figure Legends and Table Captions

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

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

Figure 1. Different Regions of *Argyrosomus hololepidotus* Epidermis (H&E, 40 \times). 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 \times). 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 \times). Goblet mucus cell (G), microridges, squamous cell(S).

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

