



## مطالعه سلول‌های تولیدکننده لعاب (Mucous cells) در کپور ماهی پرورشی (*Cyprinus carpio*) و واکنش آنها در برابر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی

غلامرضا نورزاد<sup>۱</sup>، هادی دهقانی<sup>۱</sup>، مهناز باقرشیرودی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس

### چکیده

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۲/۰۲/۲۹

اصلاح: ۹۲/۰۶/۰۵

پذیرش: ۹۲/۰۶/۰۹

### کلمات کلیدی:

سلول‌های لعابی

ماهی کپور

فلس ماهی

زمان مرگ

سلول‌های تولیدکننده لعاب در بخشی از اپیدرم کپور ماهی پرورشی (*Cyprinus carpio*) و تغییرات آنها در طول زمان پس از مرگ ماهی بررسی شد. همچنین رفتار این سلول‌ها در مقابل فاکتورهای خارجی مانند حرارت و آنتی‌اکسیدان‌های معدنی و آلی (بی‌سولفیت سدیم و هیدروکینون) و احتمال استفاده از این سلول‌ها به عنوان معرف و شاخص زمان مرگ ماهی و تشخیص احتمالی شرایط فیزیکی و شیمیایی که ماهی در آن مرده، بررسی شد. ماهی‌های مورد مطالعه از مزارع پرورش ماهی واقع در نیشابور تهیه گردیدند و در زمان‌های مختلف نمونه‌هایی از بافت پوششی ماهی تهیه گردید و با استفاده از معرف‌های متفاوت و مورد استفاده در سیتوشیمی مانند پاس (PAS)، آلدئیدفوشین، کارمین و آبی‌متیلن، رنگ‌آمیزی شد. نتایج حاصل از تحقیق نشان دادند که با افزایش درجه حرارت و کاهش اکسیژن (در آب ساکن) سرعت نابودی سلول‌های اپیدرمی افزایش می‌یابد. آخرین سلول‌ها بعد از حدود ۱۳۰ ساعت در اپیدرم در جریان آب تازه و حرارت ۱۷ تا ۱۸ درجه نابود می‌شوند. در دمای ۲۵ درجه، سرعت نابودی آنها به دو برابر افزایش پیدا می‌کند. تزریق آنتی‌اکسیدان‌های به کار برده شده نه تنها تأثیری در افزایش مقاومت سلول‌ها نداشتند، بلکه مقاومت آنها را به شدت کاهش دادند به شکلی که پس از ۹۰ ساعت، اندکی از سلول‌های لعابی باقی می‌ماند. به نظر می‌رسد که با توجه به نتایج کسب شده، روش بررسی سلول‌های تولیدکننده لعاب در اپیدرم ماهیان می‌تواند به‌عنوان یک شاخص برای تشخیص زمان مرگ ماهی مورد استفاده قرار گیرد در این میان، بهترین نتیجه را آلدئیدفوشین با فیکساتور بوئن ارائه می‌دهند.

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: gnourzadf@yahoo.com

## مقدمه

سلول‌های تولید کننده لعاب در دنیای جانوران گسترش فراوانی دارند. در ماهی‌ها، این سلول‌ها در آبشش‌ها، دیواره لوله گوارشی و مخصوصاً پوست پراکنده‌اند (Hasse, 1911; Bluem and Fidler, 1964). نقش این سلول‌ها در پوست ماهی، عبارت است از: لغزنده نمودن پوست، کاهش اصطکاک، ایجاد PH اسیدی و ممانعت از رشد انگل‌ها.

اپیدرم ماهیان مانند سایر مهره‌داران از یک بخش پوشاننده چند لایه تشکیل شده است که معمولاً سه تیپ سلول ترش‌چی در آن شناخته می‌شود، سلول‌های باتونی (Club cells)، سلول‌های دانه‌دار (Corn cells) و سلول‌های لعابی (Mucous cells). لایه‌های تحتانی لایه پوششی، زاینده است و از آن در نتیجه تقسیم، سلول‌های جدید به وجود می‌آیند. سلول‌های تولید شده به لایه‌های بالاتر مهاجرت کرده و به صورت زیر تمایز می‌یابند:

الف) سلول‌های لعابی (Mucose cells): بیشتر سلول‌های اپیدرمی، به صورت سلول‌های لعابی تمایز پیدا می‌کنند، که در اثر تولید یک واکوئل بزرگ پر از لعاب، شکل کروی و حالت یکنواختی به خود می‌گیرند. طی این جریان هسته سلول به بخش زیرین مهاجرت می‌نماید. لایه خارجی اپیدرم با حضور پیوسته این سلول‌ها مشخص می‌شود.

ب) سلول‌های باتونی (Club cells): این سلول‌ها طویل هستند و با پایه‌ای پهن روی بازال لامینا قرار گرفته و تقریباً در تمام اپیدرم کشیده شده‌اند (Whitcar, 1981; Wheater and Mittal, 1983). این سلول‌ها ائوزینوفیل بوده و در گریه‌ماهی راه‌راه تولید زهر می‌کنند. در درون هسته بزرگ انتهایی خود حاوی مواد متراکمی هستند. در این سلول‌ها پروتئین‌های رشته‌ای و موکوپلی‌ساکاریدها با روش‌های سیتوشیمی مشخص می‌شوند. ترشحات این نوع از سلول‌ها می‌بایست باعث سفتی مخصوص لعاب گردند. در سیتوپلاسم سلول‌های باتونی در امتداد سطح سلول، رشته‌های ظریف از نوع تونوفیل‌مانت وجود دارد (Leino, 1982).

ج) سلول‌های دانه دار (Corn cells): این دسته از سلول‌ها در سیتوپلاسم خود حاوی دانه‌های فراوان می‌باشند این سلول‌ها نیز در ادامه رشد حالت کروی به خود گرفته، در حالیکه هسته آنها در وسط باقی می‌ماند. اپیدرم سایر ماهیان نیز دارای انواع سلول‌های ترش‌چی می‌باشد. به طور کلی در ماهیان استخوانی، سلول‌های ترشح‌کننده لعاب، بینابین سلول‌های پوششی جلب توجه می‌نمایند (Leino, 1982).

هر چند که برخی شواهد حاکی از وجود غدد ساده، پر سلولی و لوله‌ای می‌باشند، ولی معمولاً غدد جلدی تک سلولی هستند. این غدد عمدتاً موکوسی یا سروزی بوده و در اندازه‌های مختلف دیده می‌شوند. در بررسی با میکروسکوپ نوری این سلول‌ها تفاوت‌های کیفی نشان می‌دهند. با این وجود در درشت‌نمایی‌های بیشتر نشان داده شده که این سلول‌ها، از سلول‌های کوچک نزدیک به قاعده اپیدرم که در حین مهاجرت به سطح، تمایز یافته اند حاصل شده‌اند. حین مهاجرت در این سلول‌ها دانه‌های ترش‌چی افزایش یافته و سلول‌ها بزرگ می‌شوند. سلول‌های باتونی که تصور می‌شود نوعی سیمان بین سلول‌ها ترشح می‌کنند، به همین روش از غشاء پایه به ناحیه میانی اپیدرم مهاجرت می‌کنند.

غدد سمی که برخی از آنها چندسلولی هستند، در بعضی از گونه‌ها با لایه سلول‌های خاری شکل (Spine cells) در ارتباط هستند (Robertes, 1993).

انشعابات متعددی از سلول‌های ترش‌حی موكوسی آمپولی شكل، در بين سلول‌های پهن اپیدرم پراکنده شده‌اند. این سلول‌ها، موكوس لغزنده‌ای در پوست بسیاری از ماهیان ترشح می‌کنند. در عده‌ای از ماهیان نظیر Hagfish، کار این سلول‌ها اختصاصی و منحصر به فرد است و مواد ترش‌حی آنها کربوهیدرات‌های سولفات‌ه (سولفو موسین‌ها) می‌باشد (Lippisch, 1989). کم شدن موكوس باعث كندی حرکت ماهی در هنگام شنا می‌گردد. همچنین هنگام جدا شدن لایه موكوس انگل‌ها یا عوامل تحریک‌کننده چسبیده به پوست را جذب و همراه خود از بدن ماهی دور می‌نماید. در بعضی از گونه‌ها، موكوس موجب انعقاد و رسوب ذرات خارجی معلق در آب می‌شود. در کوسه‌ماهی، سلول‌های رشته‌ای (Thread cells) وجود دارند، که رشته‌های مارپیچی از موكوس ترشح می‌نمایند (Sire and Arnulf, 2000).

نکته جالب، شباهت مورفولوژیکی و خصوصیات رنگ‌پذیری بین سلول‌های موكوسی و سلول‌های دیگری به نام Rodlet cells می‌باشد که توسط عده‌ای از محققین دیگر بین سال‌های ۱۹۷۲ تا ۱۹۸۹ مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است (Manera and Dezfuli, 2004; Dezfuli et al., 2007). سلول‌های Rodlet بیشتر در روده و آبشش ماهیان دیده می‌شوند. در مطالعه میکروسکوپ الکترونی، این سلول‌ها دارای مورفولوژی سلول‌های ترش‌حی می‌باشند. محتوی ترش‌حی دانه‌های سیتوپلاسمی سلول‌های لعابی Rodlet از نوع موكوپلی‌ساکارید، گلیکوپروتئین، لیپوپروتئین، چربی و RNA می‌باشد (Leino, 1974 and 1996; Mandal et al., 2005).

از جمله تحقیقات انجام گرفته روی این سلول‌ها و فلس‌های ماهی می‌توان به تحقیقات درباره کنترل هورمونی و تولید سلول‌های لعابی در سیکلیده‌ها (Bluem and Fidler, 1964; Patt and Patt, 1969)، بررسی ساختمان ظریف اپیدرم دو گونه سالمونیده با تحقیق بر روی سلول‌های لعابی اپیدرم قزل‌آلا (Lippisch, 1989)، روی فلس‌های تیلاپیا و روی ساختمان و تکامل برجستگی‌های کیتینی فلس‌های تلوستن‌ها و ساختمان ظریف اپیدرم اشاره نمود (Olivereau and Lemoine (1971; Harris and Hunt; 1978; Hughes, 1981; Kikuchi and Makino, 1990; Sire and Arnulf, 2000).

در این تحقیق با کمک روش‌های رنگ‌آمیزی اختصاصی به بررسی سلول‌های تولیدکننده لعاب در بخشی از اپیدرم کپور ماهی پرورشی (*Cyprinus carpio*) که فلس را می‌پوشاند پرداخته شده و تلاش شده است تا تصویری عینی از حساسیت سلول‌های لعابی به عنوان تولیدکنندگان لعاب که ماهی را در برابر نفوذ میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و نیز چسبیدن انگل‌های پوستی حفظ می‌کند تهیه گردد. همچنین تغییرات آنها در طول زمان پس از مرگ ماهی و نیز رفتار آنها در مقابل فاکتورهای خارجی مانند حرارت و آنتی‌اکسیدان‌های معدنی و آلی (بی‌سولفیت سدیم و هیدروکینون) و احتمال استفاده از این سلول‌ها به عنوان معرف و شاخص زمان مرگ ماهی و احتمالاً شرایط فیزیکی و شیمیایی که ماهی در آن مرده است، مورد مطالعه قرار می‌گیرد. جواب این سؤال برای بیولوژیست‌های ماهی‌شناس، متخصصین محیط‌زیست و آلودگی‌های آب نیز حائز اهمیت است.

#### مواد و روش‌ها

جانوران مورد آزمایش از نمونه‌های کپورماهی‌های پرورشی به طول ۲۵-۲۰ سانتی متر و به وزن حدود یک کیلوگرم از مراکز پرورش ماهی نیشابور تهیه شدند. ماهیان با ضربه‌ای به جمجمه کشته شده و بعد در آکواریومی ۲۰ لیتری که جریان آرامی از آب تازه از آن عبور می‌کرد نگهداری شدند. سپس در زمان‌های معین با فواصل ۱۰ ساعت به وسیله پنس از

بخش‌های مختلف پوست، مخصوصاً دو طرف بدن، میان خط پهلوئی و باله پشتی و نیز زیر خط میانی و بخش شکمی هر بار شش فلس جدا و در محلول ثابت کننده، تثبیت گردیدند.

اولین نمونه‌برداری، بلافاصله پس از مرگ ماهی و نمونه‌برداری‌های بعدی با فواصل زمانی ۱۰ ساعته انجام گرفتند. فلس‌ها پس از ثابت شدن در محلول بوئن (Bouin) و فرمالین ۱۰٪، با آلدئید فوشین طبق روش‌های Gomori، متد PAS، کارمین، آبی متیلن، آنیلین الکی به طور آزمایشی و مقایسه‌ای رنگ‌آمیزی شده و هنگام ارزیابی با فلس‌های کنترل مقایسه گردیدند. از بین روش‌های مختلف مورد آزمایش، آلدئید فوشین به عنوان روش مناسب و استاندارد، انتخاب شد (Lehmann, 1978; Romeis, 2010).

ماهیان مورد آزمایش به ۴ گروه تقسیم شدند که عبارتند از:

گروه اول: جانورانی که به عنوان کنترل در آب معمولی و شرایط طبیعی در درجات حرارت بین ۱۲ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و مورد آزمایش قرار گرفتند.

گروه دوم: جانورانی که در آب با دمای بالای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سلول‌های آنها در هر مرحله مورد مطالعه قرار گرفتند.

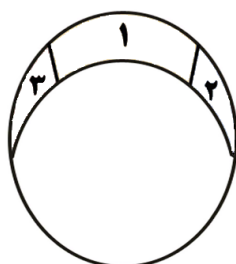
گروه سوم: با تزریق هیدروکینون. به این منظور مقدار ۰/۵ گرم پودر هیدروکینون در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل شده و در سه نوبت، هر یک به فاصله ۲ روز مقدار ۱ سی‌سی در بخش خلفی حفره شکمی تزریق و دو روز پس از آخرین تزریق جانوران با ضربه سر کشته شدند.

گروه چهارم: با تزریق بی‌سولفیت سدیم. مقدار یک گرم از آنرا در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل نموده و ۰/۵ سی‌سی از محلول در بخش خلفی حفره شکمی تزریق شد.

هر یک از نمونه‌برداری‌های گروه اول و دوم در زمان‌های مختلف به عنوان کنترل با اولین نمونه‌برداری که بلافاصله پس از مرگ جانور انجام شده بود، از نظر وفور و پراکندگی سلول‌های لعابی مورد مقایسه قرار گرفتند. به دلیل آنکه تهیه جریان پیوسته آبی با دمای ثابت و بدون تغییر کیفیت آن در آزمایشگاه امکان‌پذیر نبود، لذا دمای آب لوله در فصول مختلف مورد استفاده قرار می‌گرفت.

به دلیل تفاوت‌هایی که از نظر واکنش‌های رنگی، میزان رنگدانه‌ها و یا آسیب‌هایی که در اثر برداشتن فلس ماهی به وسیله پنس به وجود می‌آید، عکس‌برداری از محل‌های مناسب‌تر انجام گرفت و ضمن آن به تغییرات ایجاد شده در سایر نواحی نیز اشاره شد. به منظور بررسی سلول‌های لعابی موجود در اپیدرم فلس، بخش خارجی آن به سه ناحیه تقسیم گردید (شکل ۱).

لام‌های تهیه شده از گروه‌های مختلف در مرکزی‌ترین قسمت ناحیه ۱ به کمک میکرومتر سلول‌های موکوسی در وسعتی به طول ۰/۶۸ میلی‌متر و عرض ۰/۸۵ میلی‌متر شمارش شدند. ناحیه شمارش شده در واقع قسمت مرکزی بخشی از فلس است که توسط اپیدرم پوشانده می‌شود و بیش از سایر نواحی نیز در معرض اصطکاک و تأثیر فاکتورهای خارجی قرار دارد. نتایج شمارش در مساحت ذکر شده در جدول ۲ آمده است.



شکل ۱. مناطق مورد بررسی در اپیدرم فلس: منطقه ۱) وسعت ۳/۵ کل سطح مطالعه شده؛ منطقه ۲) وسعت ۱/۵ کل سطح مطالعه شده؛ منطقه ۳) وسعت ۱/۵ کل سطح مطالعه شده.

به منظور شناخت بهتر کیفیت آبی که ماهی در آن نگهداری می‌گردید، مقداری از نمونه مورد استفاده از آزمایشگاه محل تحقیق جهت آنالیز به آزمایشگاه منطقه‌ای مشهد ارسال شد (جدول ۱). روش‌های سیتوشیمی جهت رنگ‌آمیزی سلول‌های لعابی طبق روش Gomori، مورد استفاده قرار گرفتند (Romeis 2010; Lehmann 1978).

جدول ۱. نتیجه آزمایش کیفیت آب مورد استفاده در تحقیق.

مقدار	فاکتور
7/6	PH
G83 mhos/cm	Conductivity (EC)
212 mg/l As caco3	Total Hardness
39.05 mg/l As cl	Chlorides
0.03 mg/l As po4	Phosphates
7.88 mg/l	Free co2
149.56 mg/l	Total co2

## نتایج

وفور سلول‌ها در واحد سطح انتخابی در لام‌ها، در گروه کنترل، بین ۲۲ تا ۳۰ و ندرتا بیشتر می‌باشد، که متوسط وفوری برابر ۲۹ سلول لعابی به دست می‌آید. در تمام فلس‌های بررسی شده پراکندگی تقریباً یکنواختی از سلول‌های لعابی در مناطق ۱ و ۲ و ۳ به چشم می‌خورد که به صورت موضعی می‌تواند تغییر کند.

جدول ۲. وفور سلول‌های لعابی در سطح ۰/۰۸۵ میلی متر از اپیدرم فلس ماهی کپور پرورشی.

شماره لام	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۶
تعداد سلول‌های شمارش شده	۳۰	۳۵	۳۰	۲۵	۳۳	۲۴	۲۲	—	۲۹	۲۵	۳۷

در اینجا به بررسی نتایج به دست آمده در گروه‌های سه گانه ماهیان مورد آزمایش می پردازیم:

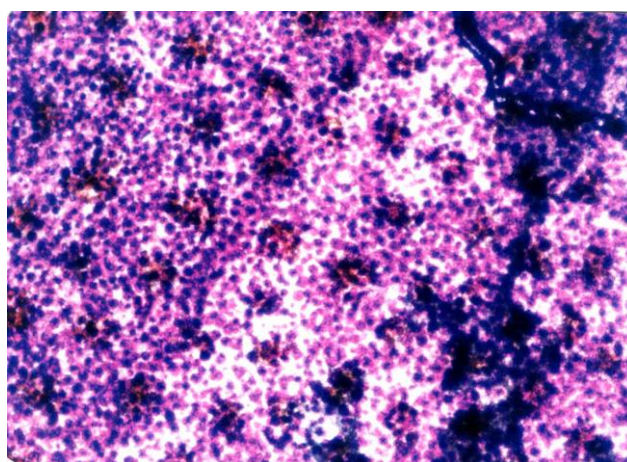
گروه اول: تعداد ماهیان مورد آزمایش در مرحله اول ۱۰ عدد بود. در تمام ماهیان مورد آزمایش دوام سلول‌های لعابی و تراکم آنها در طول زمان کاهش پیدا می کند. علاوه بر این، اثر تغییرات حرارت نیز قابل مشاهده بود. در تمام موارد، بخش بالای خط پهلوئی از نظر سلول‌های لعابی غنی تر ظاهر می شد. اولین نمونه برداری بلافاصله بعد از مرگ ماهی انجام می شود.

تراکم سلول‌های لعابی بسیار زیاد است. در مواردیکه به دلیل ضخامت لایه پوششی، عبور نور و رؤیت سلول‌ها زیر میکروسکوپ دچار اشکال می شد، بخش رویی اپیدرم جدا می گردید. در اغلب موارد سلول‌های رنگدانه دار نیز همراه هستند. حتی پس از ۱۰ ساعت تعداد سلول‌های لعابی تغییری نشان نمی دهد (شکل ۲).

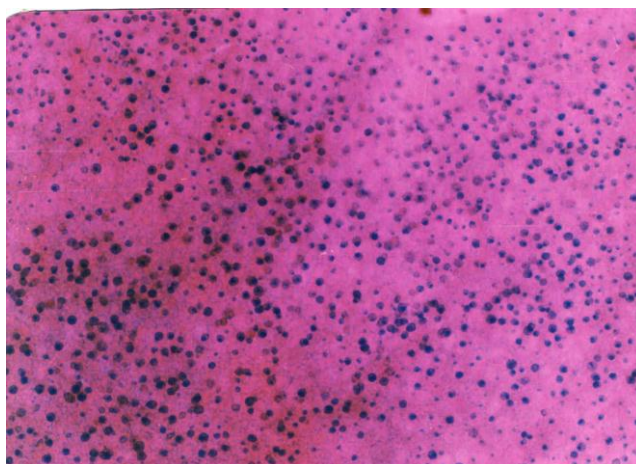
گروه دوم: تعداد سلول‌های لعابی نسبت به گروه اول کم تر است.

گروه سوم: از ۹ ماهی تزریق شده فقط ۳ ماهی، نوبت‌های سه گانه تزریق را تحمل کردند (شکل ۴). ناآرامی، بیرون پریدن از آکواریوم، ترشحات فراوان لعاب و تغییرات سریع بافتی مثل تورم و نرم شدن بافت، از نشانه‌های تأثیر هیدروکینون بودند. کاهش تعداد سلول‌ها از ۲۰ ساعت شروع و پس از ۹۰ ساعت اثری از آنها باقی نمی ماند.

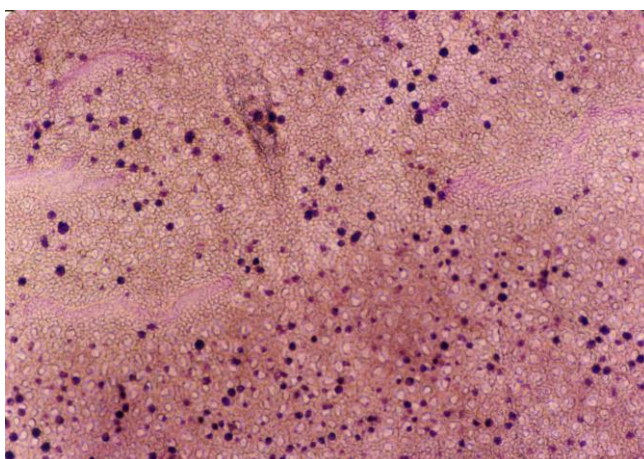
گروه چهارم: فقط یک ماهی تزریق سه گانه را در طول یک هفته تحمل کرد. در اینجا نیز سلول‌های لعابی به مقدار کم و با پراکندگی نامنظم قابل مشاهده بودند (شکل ۵). بدین ترتیب وفور سلول‌ها در واحد سطح انتخابی بین ۲۲ تا ۳۰ و ندرتاً بیشتر می باشد که به عنوان متوسط می توان وفوری برابر ۲۹ سلول لعابی را انتخاب نمود.



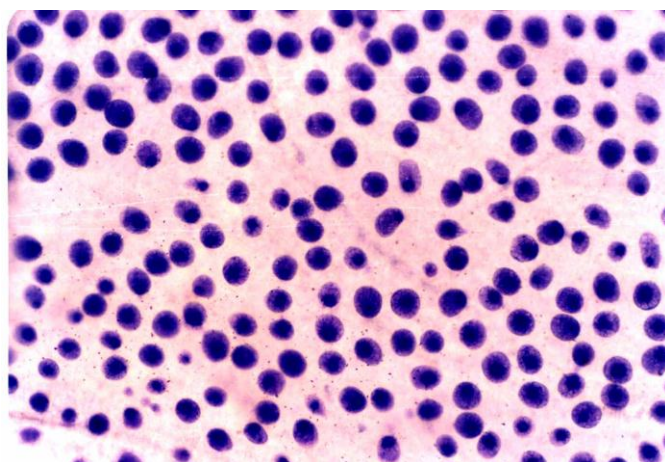
شکل ۲. ۱۰ ساعت پس از مرگ. فیکساتور بوئن، رنگ آمیزی آلدنید فوشین (درشت نمایی  $\times 100$ ).



شکل ۳. منطقه یک، ۴۶ ساعت پس از مرگ. رنگ آمیزی PAS. فیکساتور بوئن (درشت نمائی  $\times 100$ ).

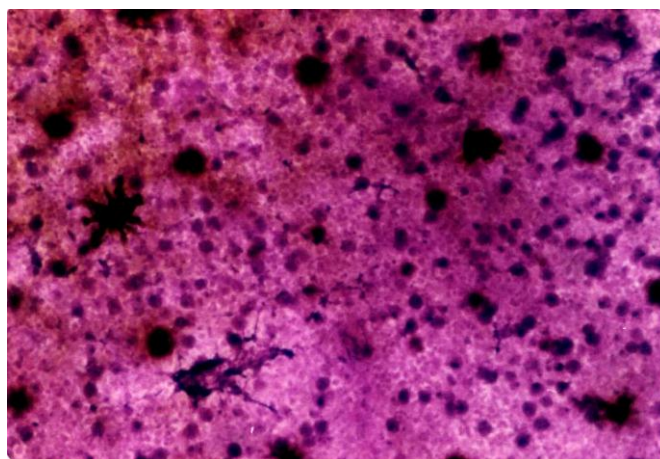


شکل ۴. سه ساعت پس از مرگ. فلس متعلق به ماهی تزریق شده با هیدروکینون. منطقه یک. رنگ آلدئید فوشین. فیکساتور بوئن. تعداد و تراکم سلول‌ها با تراکم سلولی بدون هیدروکینون پس از ۱۱۰ ساعت مطابقت می‌کند (درشت نمائی  $\times 33$ ).



شکل ۵. نمونه برداری از ماهی زنده تزریق شده با بی سولفیت سدیم. رنگ آمیزی آبی میتلن. منطقه یک. تراکم سلولی آشکارا کمتر از تراکم طبیعی سلول‌های لعابی است (بزرگ‌نمایی  $\times 40$ ).

در تمام فلس‌های بررسی شده پراکندگی تقریباً یکنواختی از سلول‌های لعابی در مناطق ۱، ۲ و ۳ به چشم می‌خورد که به صورت موضعی می‌تواند تغییر کند. در زمان‌های ۱۰ و ۲۰ ساعت پس از مرگ تغییر در تراکم سلول‌ها چشمگیر نیست. با گذشت حدود ۵۰ ساعت پس از مرگ ماهی در حرارت ۱۴ درجه، تدریجاً گسیختگی در قسمت‌های حاشیه‌ای فلس به چشم می‌خورد. علاوه بر این تراکم سلول‌ها تغییر محسوسی می‌کند. پس از حدود ۸۵ ساعت سلول‌های لعابی کاهش آشکاری می‌یابند. ۱۴۳ ساعت پس از مرگ نه تنها تعداد بسیار کمتری سلول در بخش‌های میانی فلس (منطقه مورد مطالعه) به چشم می‌خورد، بلکه در مواردی نیز حدود مشخص خود را از دست می‌دهند، که دلیل آن تغییرات اتولیز می‌باشد (شکل ۶).



شکل ۶. ناحیه یک، ۱۴۳ ساعت پس از مرگ ماهی. رنگ آلدئید فوشین. فیکساتور بوئن. تعدادی سلول لعابی به صورت پراکنده باقی مانده‌اند که آنها نیز در حال اتولیز هستند. توده‌های بزرگتر رنگین سلول‌های پیگمان‌دار هستند (درشت نمائی  $\times 100$ ).

با استفاده از رنگ‌هائی مانند PAS یا کارمین، سلول‌ها با وفور کمتری ظاهر می‌شوند. استفاده از آبی متیلن و آنیلین نتایج بهتری به دنبال دارد، ولی در تمام شرایط استفاده از آلدئید فوشین بیشترین تعداد سلول را ظاهر ساخته و واضح‌ترین تصویر را از پراکندگی و مورفولوژی سلول‌ها بوجود می‌آورد. بین فیکساتورها محلول بوئن بهترین نتیجه را دارد. حرارت، نابودی سریعتر سلول‌های لعابی را به دنبال دارد، به طوریکه پس از حدود ۲۰ ساعت در آکواریوم محتوی آب ساکن، وفور سلول‌ها با نمونه‌های گرفته شده از آب جاری در حرارت ۱۷-۱۸ درجه سانتی‌گراد پس از ۵۰ ساعت قابل مقایسه است. نمودارهای ۸ و ۹ به خوبی وابستگی سرعت نابودی سلول‌های لعابی را به زمان و درجه حرارت آب نشان می‌دهند.

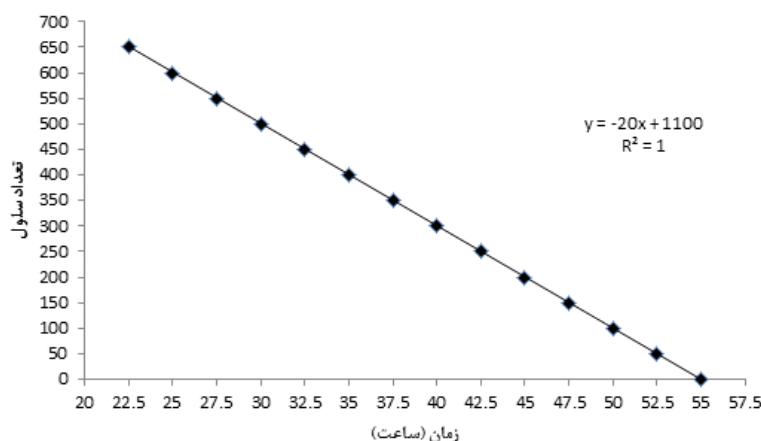
#### بحث

در تحقیقات انجام گرفته اولیه نقش هیپوفیز در تولید سلول‌های لعابی تأیید شده است (Bluem and Fidler, 1964; Maltziej, 1971; Olivereau 1971; Lehmann, 1978). در ماهی طلائی (*Carassius amratus*) که هیپوفیز آن برداشته شده بود، تعداد سلول‌های لعابی در وسعتی برابر  $0/09$  میلی متر مربع ۹۸ عدد شمارش شد. علاوه بر این در سال ۱۹۶۵ متوجه شدند که هورمون پرولاکتین، تعداد سلول‌های موکوسی را در ماهیان تیلایپا افزایش می‌دهد (Bluem and Fidler, 1964; Pickering, 1974).

با وجود اینکه برداشتن هیپوفیز در ماهیان تلوستتن مختلف موجب کاهش تعداد سلول‌های موکوسی آنها می‌شود، تعداد سلول‌های موکوسی در *Tilapia mossambica* نه با برداشتن هیپوفیز و نه با تزریق پرولاکتین گوسفندی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. از تحقیقات مشابه روی اثرات شوری محیط، پرولاکتین، هورمون رشد و کورتیزول بر روی سلول‌های مخاطی ماهی *Leptocottus armatus* نتیجه‌گیری شد که تحریک سلول‌های جامی شکل آبشش ماهیان با تزریق پرولاکتین گوسفندی شدت می‌یابد (Marschall, 1978).

با استفاده از روش‌های سیتوشیمی و رنگ آمیزی‌های مختلف، در این تحقیق سعی شد متد رنگ‌آمیزی استاندارد برای رنگ‌آمیزی سلول‌های لعابی از بین روش‌های ممکن، انتخاب و با کمک سلول‌های لعابی (Mucous cells) در اپیدرم ماهی کپور تصویری گویا درباره مقاومت و حساسیت این سلول‌ها به عنوان تولیدکنندگان لعاب که ماهی را در برابر نفوذ میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و نیز تثبیت اکتوپارازیت‌ها محافظت می‌نمایند (Anbuhezshion and Ramasamy, 2011)، حاصل گردد. هدف اصلی یافتن پاسخی برای این سؤال بود که آیا می‌توان از این سلول‌ها به عنوان شاخصی جهت تعیین زمان مرگ ماهی در محیط استفاده نمود یا خیر؟ در این رابطه تأثیر حرارت، PH و دوترکیب شیمیایی آنتی‌اکسیدان یعنی بی‌سولفیت سدیم و هیدروکینون مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج آزمایشات را می‌توان به شرح زیر مورد بحث قرار داد:

۱) تخریب سلول‌های لعابی در اپیدرم ماهی کشته شده تدریجی است و با پیشرفت زمان، افزایش می‌یابد (شکل ۷)، به طوری‌که بدون مشکل می‌توان آنرا به عنوان شاخص جهت تعیین زمان مرگ ماهی مورد استفاده قرار داد. با وجود نوسانات موضعی در فراوانی سلول‌های لعابی در زمان‌های مختلف می‌توان گفت که حدود ۵۰ ساعت پس از مرگ ماهی در دمای ۱۸- ۱۷ درجه سانتی‌گراد تعداد سلول‌های لعابی به طور واضحی کاهش پیدا می‌کند و این با تحقیقات دیگر نیز در مورد ماهی قزل‌آلا تطبیق می‌نماید (Lehmann, 1978).

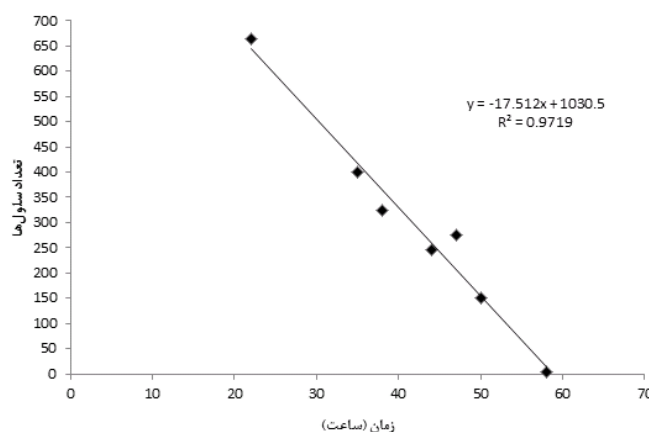


شکل ۷. در منحنی فوق رابطه بین تعداد سلول‌های باقیمانده در طول زمان در حرارت‌های ۱۴-۱۵ درجه مشاهده می‌گردد.

آخرین سلول‌ها پس از حدود ۱۴۰ ساعت در اپیدرم نابود می‌شوند، که مقاومت بیشتری را نسبت به ماهی قزل‌آلا نشان می‌دهد. این زمان در گروه‌های مختلف ماهی قابل تغییر بوده و برای هر گروه باید جداگانه مشخص گردد. این زمان‌ها برای ماهی کپور پرورشی معتبرند، که قبل از مرگ تحت تأثیر مواد شیمیایی (بازها، اسیدها و مواد سمی)، کمبود اکسیژن، قرار گرفتن زیر گل و لای و رسوبات نبوده‌اند.

۲) با افزایش درجه حرارت، سرعت تحلیل رفتن سلول‌های لعابی افزایش می‌یابد، به طوری‌که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سرعت نابودی آنها تقریباً دو برابر می‌شود (شکل ۸).

۳) مرگ ماهی در اثر مسمومیت یا کمبود اکسیژن، دور ماندن سلول‌های لعابی از جریان آب طبیعی، سرعت نابودی آنها را افزایش می‌دهد و این نتایج با نتایج تحقیقات دیگران روی سلول‌های تولیدکننده لعاب و Rodlet cells تطبیق می‌نمایند (Olivereau and Leemoine, 1971; Pickering, 1974; Lehmann, 1978; Leino, 1982; Lippisch, 1995).



شکل ۸. رابطه تعداد سلول‌ها در طول زمان و حرارت‌های ۲۵-۳۰ درجه سرعت تخریب سلول‌های لعابی را نشان می‌دهد.

۴) تزریق هیدروکینون و بی‌سولفیت سدیم به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک با انتظار افزایش مقاومت سلول‌های لعابی انجام گرفت، در حالیکه نتایج به دست آمده عکس آن را ثابت کردند که عبارتند از:

الف) تقریباً تمام ماهیان مورد آزمایش تزریقات را به سختی تحمل کرده و گاهی پس از اولین یا دومین تزریق از بین می‌رفتند.

ب) از چهار ماهی تزریق شده با هیدروکینون که به فواصل ۲، ۳، و ۶ روز تزریق شدند، پس از ۹۰ ساعت هیچکدام اثری از سلول‌های لعابی نشان نمی‌دادند.

۵) ماهیان تزریق شده در طول تزریقات، به صورت نا آرام، با ترشحات لعاب قبل و بعد از مرگ مشخص می‌شدند. لعاب به صورت لایه از بدن جدا و در سطح آب شناور می‌گردید.

۶) به طور کلی تزریق هیدروکینون سرعت نابودی سلول‌ها را به شدت افزایش می‌داد. علاوه بر این، تمام بدن دستخوش دگرگونی و تجزیه می‌گردید.

۷) تزریق بی‌سولفیت سدیم برای جانور تحمل ناپذیرتر بود. از چهار ماهی تزریق شده فقط یکی، سه تزریق پی‌درپی را تحمل نمود. در این ماهی نیز کاهش مقاومت سلول‌های لعابی به چشم می‌خورد.

به طور کلی این روش می‌تواند به صورت استاندارد در شرایط متفاوت و گروه‌های مختلف ماهیان بررسی گردد. در این حالت می‌توان از آن به عنوان یک شاخص برای تعیین زمان مرگ ماهی و شرایطی که ماهی در آن از بین رفته است استفاده کرد.

## منابع

- Anbuchezhian., R., Gobinath, C., Ravichandran, S. 2011. Antimicrobial peptide from the epidermal mucus of some esturame cat fishes. *World Applied Sciences Journal*. 12 (3): 256-260.
- Bluem, V., Fidler, K. 1964. Hormonal control of productive behavior in some cichlid fish. *Endocrinology*. 5: 186-196.
- Dezfuli, B., Capuano, S., Simoni, E., Previati, M., Giari, L. 2007. Rodlet Cells and the sensory systems in Zebra fish (*Danio rerio*). *The Anatomical Record*. 290: 200-367.
- Hasse, A. 1911. Der Morphologische Entwicklung der Chetonoidschuppen. *Anatomische Anzeiger*. 40: 337-356.
- Harris, J.E., Hunt, S. 1978. The fine structure of the epidermis of two Species of Salmonid fish. The Atlantic salmon (*Salmo solar*) and the brown trout. *Cell and Tissue Res*. 163: 535-543.
- Hughes, D.R. 1981. Development and organisation of the posterior field of ctenoid scales in the plathycephalidae. *Copeia*. 3: 596-606.
- Kikuchi, S.L., Makino, N. 1990. Characteristics of the progression of squamation and the formation of ctenii in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of experimental zoology*. 254: 177-185.
- Lagler, K.F., Bardach, J.E., Miller, R.R. 1962. *Ichthyology*. John Wiley and sons, New York (NY). 545 P.
- Lehmann, J. 1978. Untersuchungen zum Verhalten der Schleimzellen in der Schuppenepithel der Regenbogenforelle. *Allgemeine Fischerei-Zeitung Sonderdruck der Fischwirt*. Nr. 7
- Leino, R.L. 1974. Ultrastructure of immature, developing, and secretory rodlet cells in fish. *Cell and Tissue Research*. 155:367-381.
- Leino, R.L. 1982. Rodlet cells in the gill and intestine of *Catostomus commersoni* and *Perca fluviatilis*. A comparative of their light and electron microscopic cytochemistry with that of mucous and granular cells. *Canadian Journal of Zoology*. 60: 2768-2782.
- Leino, R.L. 1996. Reaction of rodlet cells to a myxosporean infection in kidney of the bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Canadian Journal of Zoology*. 74: 217-225.
- Lippisch, E. 1995. Scales and squamation character polarity and phyletic assessment in the family cichlidae. *Journal of Fish Biology*. 47: 91-106.
- Lippisch, E. 1989. Scales surface morphology in African cichlids (pisces, Poerciformes). *Annales du Musée Royal de l'Afrique centrale*. 257: 105-108.
- Maltheij, J.A.M., Strobant, H.W.J. 1971. The effect of osmotic experiment and prolactin on the mucous cell in the skin and the ionocytes in the gills of the teleost *Cichlasoma blocheatum*. *Cell and Tissue Research*. 121(1):93-101.
- Mandal, D.K., Roy, D., Ghosh, L. 2005. Structural organization of the olfactory epithelium of a spotted snakehead fish, *Channa punctatus*. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*. 35: 45-50.
- Manera, M., Dezfuli, B.S. 2004. Rodlet cells in teleosts: a new insight in to their nature and functions. *Journal of Fish Biology*. 65: 597-619.
- Marschall, M.S. 1978. On involvement of mucous secretion in teleost osmoregulation. *Canadian Journal of Zoology*. 54: 188-1091.
- Olivereau, M., Leemoine, A.M. 1971. Effect of prolactin in intact and Hypophysectomized Eels. *Z. vergl. Physiologie*. 73: 34-43.
- Patt, D.I., Patt, G.R. 1969. *Comparative vertebrate Histology*. New York (NY), Harper & Row. 438 p.
- Pickering, A.D. 1974. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*. 6 (2): 111-118.
- Robertes, C.D. 1993. Comparative morphology of spined scales and their phylogenetic significance in the teleostei. *Bulletin of marine sciences*. 52: 60-113.
- Romeis, B. 2010. *Ikroskopische Technik*. 20. Aufl. R. Oldenberg. Verlag Muenchen, Wien. 757p.

- Sire, J.Y., Arnulf, I. 2000. Structure and development of the ctenial spines on the scales of a teleostei fish. The Cichlid *Cichlostoma nigrofasciatum*. *Ascta zoologia*(stockholm). 8:139-158.
- Whitear, M. 1981. Secretion in the epidermis of Poliptriform fish. *Z. Mikr Anat. Forsch.* 95 (4): 531-545.
- Whitear, M., Mittal, M. 1983. Fine Structure of the club cells in the skin of Osttariophsan fish. *Z. Mikr. Anat. Forsch.* 97 (1): 141-57.