

مطالعه بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی بافت روده قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به وسیله یک مدل آزمایشگاهی

امین نعمت اللهی^{۱*} Ph.D.، حسین نورانی^۲ Ph.D.، هنگامه ملکیان^۳ D.V.M.

۱- آزمایشگاه مرجع آبزیان و آرتمیا، گروه تولیدات دامی، دانشکده مهندسی علوم زیستی، دانشگاه گنت، بلژیک

۲- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران

۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: anematolahi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۴

چکیده

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

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

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

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

واژگان کلیدی: قزل آلاهی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، بافت روده، کورتلند، مدل آزمایشگاهی

مقدمه

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

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

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

با توجه با مطالب فوق، مطالعه دستگاه گوارش ماهی و به‌ویژه بافت روده به‌عنوان یکی از پیچیده‌ترین بافت‌های بدن ماهی می‌تواند از نظر بافت شناسی، کالبد شناسی مقایسه‌ای، فیزیولوژی و زیست‌شناسی آبریان بسیار حائز اهمیت باشد. همچنین مطالعه چگونگی عمل کرد بافت روده در هنگام برخورد با عوامل بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا مانند پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها، مواد غذایی و یا مواد سمی و داروهای گوناگون از نظر فرآیند عملی آن بسیار مهم است. از طرف دیگر مطالعه مستقیم بر روی هر موجود زنده و همچنین ماهی دارای مشکلاتی است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: یکی از این موارد تاثیر عوامل ناخواسته داخلی و خارجی در حین انجام آزمایش بر روی بدن ماهی زنده است. مورد دوم وجود قانون حمایت از حیوانات (Animal Welfare)، و البته رعایت آن در هنگام انجام آزمایش است. بدین‌گونه که ماهیان به‌خاطر داشتن گیرنده‌های اپیوئیدی و ساختار مغزی، قدرت درک و احساس درد را داشته و بنابراین مطالعه مستقیم بر روی دستگاه‌های مختلف بدن ماهی دردناک بوده، که این امر بر خلاف قانون حمایت از حیوانات است. مورد دیگر آن است که آزمایش بر روی ماهی زنده نیازمند استفاده از تعداد نسبتاً زیاد ماهی است و از آنجا که ماهیان دارای حساسیت و ادراک هستند، کوشش می‌شود که در ابتدا تعداد ماهیان مورد آزمایش را کاهش داده و همچنین در تحقیقات از روش‌های آزمایشگاهی جایگزین (Alternative models) به‌جای ماهی زنده به‌منظور کاهش استرس و درد در این گونه جانوری استفاده نمود (۴، ۵ و ۶). بدین منظور، امروزه روش‌ها و مدل‌های آزمایشگاهی دستگاه‌های مختلف بدن جانوران، کاربرد بسیاری در تحقیقات پزشکی، دامپزشکی و علوم زیستی پیدا کرده است. به‌وسیله این روش‌های آزمایشگاهی می‌توان اندام‌ها، بافت‌ها و یا قسمتی از اندام‌های مختلف بدن موجودات گوناگون را در بیرون بدن حیوان در آزمایشگاه، زنده نگه‌داشت و آزمایش‌های مختلفی را بدون

مدت ۴ تا ۵ دقیقه بی‌هوش شدند. سپس به‌صورت داخل صفاقی در فاصله بین باله سینه‌ای و باله شکمی با زاویه ۴۵ درجه، (IU/kg) ۵۰۰۰ هپارین به آن‌ها تزریق شد. در ادامه ماهیان را در آب تازه و هوادهی شده قرار داده تا به‌هوش آمدند. ماهیان به‌طور متوسط ظرف مدت ۵ دقیقه به‌هوش آمده و به‌مدت ۴۰ دقیقه رها شدند تا هپارین وارد دستگاه گردش خون شده و در بدن ماهی پخش شود. سپس ماهی‌ها با استفاده از دوز بالای محلول بنزوکائین کشته و به میز جراحی انتقال داده شدند.

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

محلول نمکی کورتلند، محلولی است که برای بافت‌های ماهیان آب شیرین طراحی شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶ و ۱۹). قطعه‌ای از روده به‌عنوان قطعه‌ای که در آن هیچ مایعی تزریق نشد در محلول رینگر در دمای ۱۴ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان کنترل منفی قرار داده شد. هر قطعه روده به‌صورت مجزا داخل حمامی که هوا دهی می‌شد، به‌صورت معلق

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

تاکنون، مدل‌های مختلف تزریق به روده (perfusion models) مانند مدل باز (open)، نیمه باز (semi-open)، بسته (closed)، تزریق به یک قسمت روده گره‌خورده (tied loop) در طول عمل جراحی و همچنین تزریق کولورکتال (colorectal perfusion) مورد استفاده محققین قرار گرفته‌اند. با این حال مشکلات متعددی در حین استفاده از این روش‌های تزریقی مانند نشت محلول تزریقی، بروز ادم و از دست دادن موکوس و بافت مخاطی ممکن است ایجاد شود. ضمناً در اکثر این روش‌ها بررسی بافت‌شناسی بافت روده متعاقب تزریق که می‌تواند یک شناسه بسیار خوب برای مطالعه خصوصیات طبیعی و بقا سلولی بافت روده باشد، نادیده گرفته شده است (۹ و ۱۰ و ۱۱ و ۱۲ و ۱۳ و ۱۴). با توجه به موارد فوق، در مطالعه حاضر، مدلی آزمایشگاهی با هدف، مطالعه بافت شناسی و ریخت شناسی بافت /پی‌تلیوم روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی طراحی شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۰ قطعه ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزن ۷۵۰ گرم و میانگین طول ۳۸ سانتی‌متر تهیه شد. ماهی‌ها در تانک‌های جداگانه با ظرفیت تقریباً ۱۰۰۰ لیتر که دارای سیستم جریان آب (۱۴ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد) هوا دهی شده نیز بود، به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش، نگهداری شدند. ماهی‌ها تا مدت دو روز قبل از شروع آزمایش، روزانه به‌وسیله خوراک تجاری تغذیه می‌شدند. برای اطمینان از سلامت ماهیان، از پوست، باله و آبشش آن‌ها گسترش مرطوب تهیه گردید و هیچ‌گونه آلودگی انگلی مشاهده نشد. برای بی‌هوش کردن ماهیان از محلول بنزوکائین (اتیل آمینو بنزوات) در اتانول (۰/۱ گرم در ۱ میلی‌لیتر) استفاده شد. ماهیان به‌طور متوسط ظرف

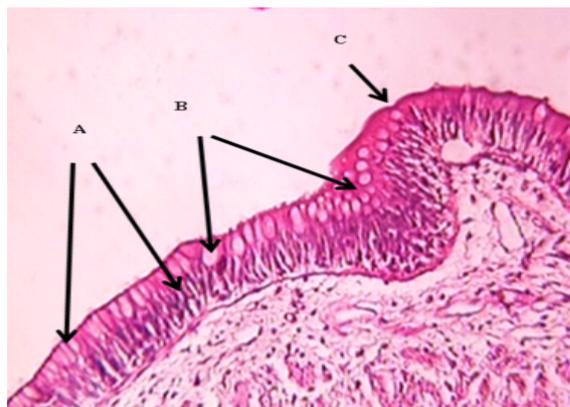
جدول ۱: ترکیبات محلول‌های رینگر و کورتلند مورد استفاده در مطالعه حاضر

	Cortland (g/L)	Ringer (g/L)
NaCl	۷/۲۵	۸/۵۰
KCl	۰/۳۸	۰/۲۰
Na ₂ HPO ₄	۰/۴۱	-
MgSO ₄	۰/۲۴	-
CaCl ₂	۰/۱۶	۰/۲۰
NaHCO ₃	۱/۰۰	۰/۰۱
Glucose	۱/۰۰	-

۲/۵ درصد گلو تار آلدهاید (glutaraldehyde) و ۲ درصد پارافورمالدهاید (paraformaldehyde) قرار داده شدند و در آب مقطر حاوی ۱ درصد اسمیم تتراکسید (osmium tetroxide) ثابت شد. بعد آب نمونه‌ها به وسیله الکل و استون گرفته شده و توسط دی اکسید کربن مایع مواد خشک کننده به طور کامل از نمونه‌ها جدا شدند. سپس نمونه‌ها با لایه‌ای از کربن و آلومینیوم آغشته شده و با لایه‌ای از پلاتین اندود شدند. بعد هر نمونه در یک قاب استوار قرار داده شده و سپس به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (JEOL, Tokyo, Japan) مورد مطالعه قرار گرفتند.

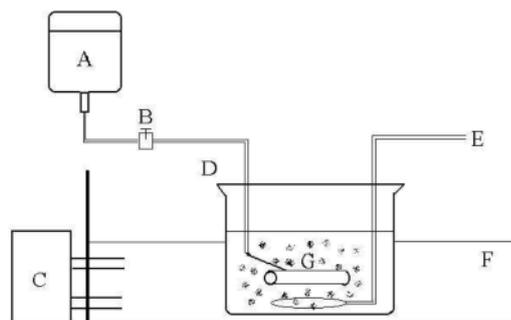
نتایج

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



شکل ۲: بافت طبیعی روده (کنترل مثبت)، که در آن اپی تلیوم سالم (A)، سلول‌های جامی (Goblet cells) (B) و حاشیه مسواکی سالم و دست نخورده (C) مشخص شده اند. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین. بزرگنمایی $\times 160$.

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

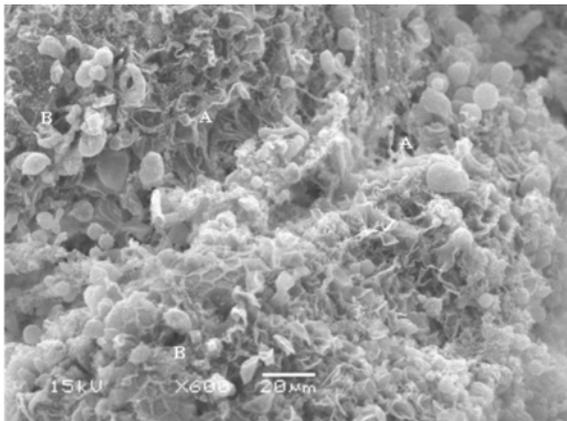


شکل ۱: نمای طرح کلی مدل آزمایشگاهی تزریق به روده ماهی A: کیسه مایع تزریقی، B: پیچ کنترل، C: سیستم سرد کننده، D: حمام رینگر، E: هواده، F: آکواریوم، G: قطعه روده ماهی

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

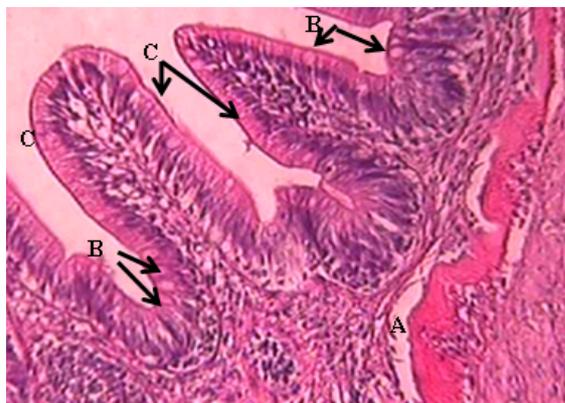
زمان برای هر آزمایش ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه در نظر گرفته شد. پس از اتمام هر آزمایش برای بررسی وضعیت ریخت شناسی و بافت شناسی روده‌ها، از قطعات روده که در آن مایع جایگزین شونده تزریق شده بود و همچنین نمونه‌های کنترل (کنترل مثبت، کنترل منفی)، نمونه‌های بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تهیه شد. جهت تهیه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

برای تهیه نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، نمونه‌ها تا حد ۵ میلی‌متر برش داده شدند زیرا محلول‌های تثبیت کننده و خشک کننده به سرعت قادر به نفوذ در نمونه‌های ضخیم‌تر نیستند. سپس نمونه‌ها در هیدروکسیل اتیل پیرازین اتان سولفونیک اسید (HEPES) بافر (pH ۷/۳، ۰/۱ مولار) حاوی

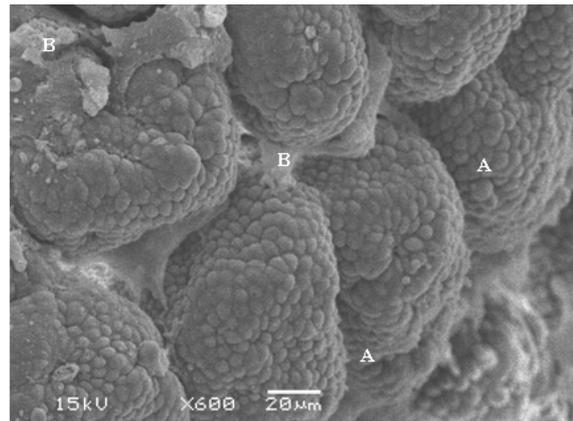


شکل ۵: بافت روده تزریق شده با رینگر پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه. در این نمونه‌های بافتی، ضایعات شدید در اپی‌تلیوم (A)، نکروز وسیع (B) و از دست رفتن ساختار روده دیده شد (۲۰µm = مقیاس).

قطعات روده که محلول رینگر + آدرنالین به مدت ۶۰ دقیقه در آن تزریق شده بود، شباهت زیادی با نمونه‌های مربوط به قطعه‌های روده که فقط محلول رینگر در آن‌ها تزریق شده بود، داشتند. در این نمونه‌ها، ضایعات شدیدی شامل ادم، دژنراسیون و نکروز مشاهده گردید و بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه از تزریق محلول رینگر + آدرنالین به بافت روده، ضایعات بافتی شامل دژنراسیون و نکروز تشدید گردید و ساختار روده کاملاً از بین رفته بود (جدول ۲). در بافت روده که محلول کورتلند به مدت ۶۰ دقیقه در آن تزریق شده بود، ادم ملایم و جدا شدگی خفیف در اپی‌تلیوم روده دیده شد و سلول‌های جامی و حاشیه مسواکی سالم و دست نخورده به خوبی دیده شد. پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه تزریق محلول کورتلند، ادم و جدا شدگی خفیف در اپیتلوم روده دیده شد و در نهایت ساختار روده به خوبی حفظ شده بود (شکل ۶ و جدول ۲).

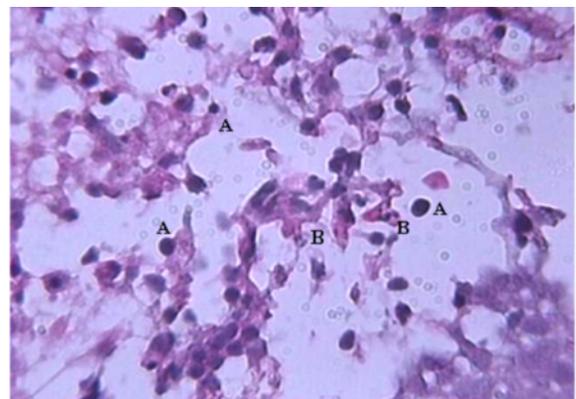


شکل ۶: بافت روده تزریق شده با محلول کورتلند به مدت ۱۸۰ دقیقه. در این نمونه‌های بافتی، ادم و جدا شدگی خفیف در اپی‌تلیوم روده دیده شد (A) و سلول‌های جامی (B) و حاشیه مسواکی سالم و دست نخورده (C) به خوبی مشخص بود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئروزین. بزرگنمایی $\times 160$.



شکل ۳: بافت طبیعی روده (کنترل مثبت)، که در آن اپی‌تلیوم سالم و دست نخورده (A) و موکوس (B) مشخص شده‌اند و ساختار کلی بافت روده سالم و بدون صدمه است (۲۰µm = مقیاس).

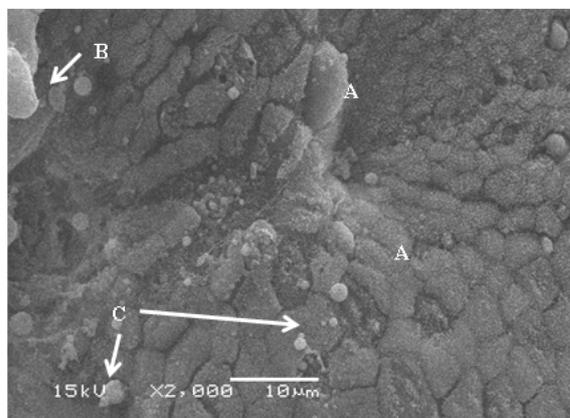
در قطعات روده تزریق نشده، که بعد از ۶۰ دقیقه در داخل بافر فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند (کنترل منفی)، دژنراسیون شدید، جدا شدگی شدید در اپی‌تلیوم روده و نهایتاً نکروز بافتی مشاهده گردید. در بعضی نمونه‌ها حالت پیکنوز و کاریورکسی متعاقب نکروز بافتی نیز دیده شد (شکل ۴). همچنین در این نمونه‌ها بعد از ۱۸۰ دقیقه،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



شکل ۴: بافت روده تزریق نشده بعد از ۶۰ دقیقه (کنترل منفی)، دژنراسیون شدید، جدا شدگی شدید در اپی‌تلیوم روده و در نهایت پیکنوز (A) و کاریورکسی (B) متعاقب نکروز بافتی. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئروزین. بزرگنمایی $\times 1000$.

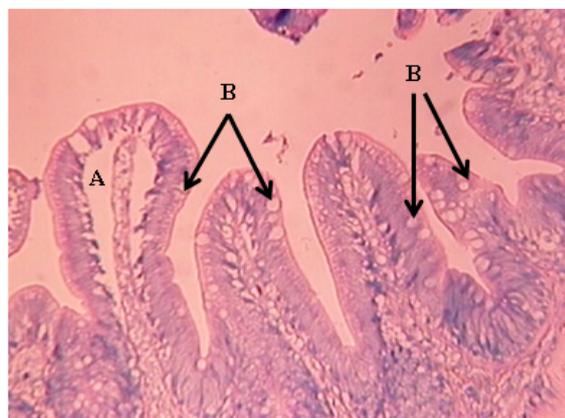
قطعات روده که محلول رینگر به مدت ۶۰ دقیقه در آن تزریق شده بود، شباهت زیادی با نمونه‌های مربوط به قطعه‌های روده که هیچ‌گونه تزریقی در آن‌ها نشده بود (کنترل منفی) داشتند. در این نمونه‌ها ادم، نکروز و از دست رفتن ساختار روده دیده شد و بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه، ضایعات بسیار شدید شده و ساختار روده به‌طور کامل از بین رفته بود (شکل ۵ و جدول ۲).

کرده بود و ادم خفیفی به همراه اندکی جدا شدگی و همچنین تعداد بسیار کمی سلول نکروزه در آن‌ها دیده می‌شد (شکل ۸ و جدول ۲).



شکل ۸: بافت روده تزریق شده با محلول کورتلند + آدرنالین به مدت ۱۸۰ دقیقه. در این نمونه‌های بافتی اپی‌تلیوم سالم و دست نخورده روده (A) و موکوس (B) مشخص شده‌اند و فقط تعداد کمی سلول نکروزه دیده شد (C) ($10\mu m$ = مقیاس)

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



شکل ۷: بافت روده تزریق شده با محلول کورتلند + آدرنالین به مدت ۶۰ دقیقه. در این نمونه‌های بافتی، ادم، جدا شدگی در اپی‌تلیوم روده (A) و سلول‌های جامی (B) دیده شد و ساختار طبیعی روده به خوبی حفظ شد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین. بزرگنمایی $\times 160$.

پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه از تزریق کورتلند + آدرنالین به داخل بافت روده، همچنان ساختار روده حالت طبیعی خود را حفظ

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

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

مناسب را برای مطالعه بافت‌های مختلف ماهیان در شرایط آزمایشگاهی و قابل کنترل ارائه دهند (۶ و ۷ و ۱۰ و ۱۲ و ۱۳ و ۱۴ و ۱۵).

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

بحث

امروزه انواع گوناگون ماهی، به‌عنوان حیوانات آزمایشگاهی توسط پژوهشگران در تحقیقات مختلف زیست‌شناسی، ژنتیک، فیزیولوژی، پزشکی و دامپزشکی آبریان استفاده می‌شوند. تاکنون محققین متعددی سعی نمودند که با استفاده از محلول‌های گوناگون جانشین شونده خون، با روش‌های آزمایشگاهی مدلی

خون گیری در مقادیر زیاد، کاری بسیار سخت و دشوار می باشد. دوما، ویسکوزیته بالای خون ماهی، باعث بسته شدن کانال های تزریق شده و جلوگیری از ادامه جریان خون و تزریق آن می کند و سوما، خون مایعی گران می باشد، در صورتی که از ویژگی محلول های جایگزین شونده، ارزان بودن و سادگی تهیه آن ها است (۱۱). همچنین پژوهشگران متعددی نیز در جستجوی یافتن مدل های آزمایشگاهی جایگزین برای اندام های مختلف داخلی از جمله روده، کبد، ریه، کلیه و مغز بوده تا بتوانند بافت و اندام های مورد نظر را برای مدت زمان کافی در شرایط آزمایشگاهی زنده نگه داشته و برای مطالعه فرآیندهای فیزیولوژیکی، سم شناسی و داروشناسی مورد استفاده قرار دهند. ضمناً، کاربردی بودن روش های گوناگون تزریق به روده در مطالعات زیست شناسی، داروشناسی و سم شناسی به اثبات رسیده و در این روش ها محققین قادر به نگه داری و حفظ سلامتی بافت روده تا پایان مطالعات خود بوده اند (۱۱ و ۱۲ و ۱۶ و ۱۷ و ۱۸ و ۱۹ و ۲۰ و ۲۱). در واقع سودمندی این روش های جایگزین آزمایشگاهی در به دست آوردن اطلاعات دارویی کامل و منظم با توجه به چگونگی روند جذب دارو و سوخت و ساز آن در بدن و عوامل موثر بر این فرآیندها به اثبات رسیده است (۱۱ و ۱۴).

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

اولین مشکل در مطالعه حاضر چگونگی انجام مراحل کانال گذاری در رگ های روده ماهی بود. به طور کلی، کالبد شکافی رگ های خونی ماهی قزل آلی رنگین کمان مرده سخت بوده و تشخیص

رگ های خونی در بافت های مرده به علت وجود چربی و زوائد باب المعدی (pyloric caeca) متعدد بسیار مشکل است. بدین منظور از انجام تکنیک کانال گذاری بر روی چهار عدد از بزرگترین ماهیان مورد مطالعه (۱۰۰۰ گرمی)، تجربه کافی برای انجام این تکنیک بر روی سایر ماهی ها به دست آمد. مسئله مهم بعدی چگونگی و سرعت تزریق بود. Perry و همکاران (۱۹) در مطالعه ای در مورد روش های گوناگون تزریق به آبشش ماهی، سرعت تزریق ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه به ازای هر کیلوگرم پیشنهاد نمودند. ولی در تحقیقات قبلی بیان شده بود که قدرت زیست اندام های تحت تزریق به سرعت تزریق مورد استفاده بستگی ندارد. به همین دلیل، چکاندن و یا تزریق به روش قطره ای، یک روش مناسب خواهد بود. Decostere و همکاران (۷) نیز از همین روش تزریقی در مطالعات خود استفاده نمودند. در مطالعه حاضر، نمونه های روده که پس از مرگ ماهی فوراً تثبیت شده بود (کنترل مثبت)، دارای بافت و اپی تلیومی سالم به همراه سلول های جامی و سایر سلول های مخاطی روده بودند (شکل ۲ و ۳). مقایسه اولیه ای بین قطعات روده ای تزریق شده به وسیله محلول کورتلند و یا محلول رینگر انجام گرفت. در بافت روده ای که به مدت ۶۰ دقیقه با محلول رینگر، مورد تزریق قرار گرفته بود، ادم، نکروز و از دست رفتن ساختار روده دیده شد و بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه تزریق رینگر، ضایعات بسیار شدید شده و ساختار روده به طور کامل از بین رفته بود. در حالی که سلول های مخاطی و زیر مخاطی اپی تلیوم روده تزریق شده با محلول کورتلند به مدت ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه، در شرایط ساختاری بهتری نسبت به تزریق با محلول رینگر قرار داشتند. آزمایشات بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی مربوط به قطعات روده ای که مورد تزریق محلول کورتلند (زمان تزریق ۶۰ دقیقه ای) قرار گرفته بودند، هیچ گونه انحطاط بافتی و نکروز را نشان نداد و نیز پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه تزریق محلول کورتلند، ادم و جداشدگی خفیف در اپی تلیوم روده و نکروز بسیار خفیف دیده شد (شکل ۴). در واقع روند انحطاط و از بین رفتن بافت روده، از ایجاد حالت پوسته پوسته و تولید یک دسته سلول مخاطی در اپی تلیوم روده تا ایجاد حالت نکروز و مرگ کامل بافت متغیر است. به عبارت دیگر، ساختار بافت روده در هنگام تزریق محلول کورتلند بهتر حفظ شده بود و میزان انحطاط سلولی به طور معنی داری کمتر دیده شد. در حقیقت، محلول تزریقی رینگر از پیشروی ادم و نیز از دست رفتن ساختار کلی بافت روده، نتوانست جلوگیری کند. در این بررسی، درجه پیشروی ادم از

۲۳ و ۲۴). Shuttleworth (۲۵) بیان نموده که آدرنالین می‌تواند مقاومت رگ‌های خونی را از طریق گشاد سازی رگ‌ها و افزایش سیالی شدن محلول تزریقی کاهش دهد. به عبارتی دیگر، آزمایشات قبلی حتی بیان کرده‌اند که درجه بالای ادم با استفاده از آدرنالین می‌تواند ایجاد شود.

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

مدل تزریق روده‌ای، مدلی ساده و موثر است که به وسیله آن، می‌توان، اولاً به مطالعه بافت شناسی روده در خارج از بدن ماهی پرداخت و دوماً مراحل اولیه برخورد عوامل بیماری‌زا (باکتری، ویروس، انگل) را بر روی بافت روده مورد بررسی قرار داد. از طرف دیگر استفاده از این گونه مدل‌های آزمایشگاهی، در مطالعات گوناگونی نظیر فارماکولوژی، سم شناسی، آسیب‌شناسی، فیزیولوژی مناسب به نظر می‌رسد. همچنین با استفاده از این روش‌ها می‌توان خواص زیان آور عوامل شیمیایی و محیطی مانند سموم گوناگون در آب (نیترات، نیتريت، آمونیاک، H₂S) را مورد بررسی قرار داد و اثرات آن‌ها را بر روی بافت‌های بدن ماهی بررسی نمود (۱۰ و ۱۲ و ۱۳ و ۱۴ و ۱۵ و ۲۱ و ۲۲ و ۲۶ و ۲۷ و ۲۸).

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

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

مقاومت رگی ماهی‌ها به آسانی تحت تاثیر شرایط فیزیولوژیکی قرار می‌گیرد و در نتیجه باعث تفاوت در جریان تزریق خواهد شد. در این مطالعه، محلول‌های مورد تزریق توسط یک صافی، پالایش شده بودند تا اجزا میکروسکوپی درون این محلول‌ها حذف گردد. Rankin و Maetz (۲۳) بیان کردند که استفاده از یک محلول نمکی فیلتر نشده باعث می‌شود که جریان تزریق ماده جانشین شونده به خوبی انجام نشود. به عبارت دیگر این محلول نمکی نمی‌تواند به راحتی در عروق و بافت جریان یابد، بنابراین، آن‌ها استفاده از یک میکرو فیلتر را جهت پالایش محلول فوق پیشنهاد نمودند. از طرف دیگر Smith (۲۴)، بیان نمود که نیازی به استفاده از محلول‌های فیلتر شده در این گونه موارد نیست. ولی به نظر می‌رسد که استفاده از فیلتر در مطالعه حاضر سودمند بود. این موضوع توسط Decostere و همکاران (۷) که به نتایج خوبی با استفاده از فیلتر (صافی) قهوه رسیده بودند، نیز اثبات شده است. محلول‌های نمکی مختلف برای تزریق روده ای در ماهی‌ها قابل استفاده اند و تفاوت‌های شیمیایی میان این محلول‌های تزریقی از اهمیت کمی برخوردار است ولی به طور کلی برخی از عناصر شیمیایی موجود در این محلول‌ها باید بیشتر مورد توجه قرار گیرند (۶ و ۷ و ۲۳). غلظت نسبتاً کم کلسیم برای جلوگیری از گرفتگی رگ‌ها و نیز pH محلول مورد تزریق بسیار مهم می‌باشند. pH بین ۷/۶ تا ۸/۱ ظاهراً ایده آل بوده و این pH ممکن است با استفاده از سدیم بی‌کربنات یا سدیم فسفات (که به عنوان بافر عمل می‌کنند) تنظیم شود. در این مطالعه، محلول کورتلند بهتر از رینگر در حفظ قدرت زیست بافت روده ای موثر بود. قبل از این، مقادیر زیادی از سدیم بی‌کربنات و سدیم فسفات به محلول اضافه می‌شد، اما در محلول‌های اخیر از خاصیت بافری کمتری استفاده می‌نمایند. اگر فشار اسمزی کلئیدی محلول مورد تزریق کمتر از فشار بافت روده باشد، ممکن است ادم افزایش یابد (۶ و

شدگی ملایمی در اپی‌تلیال بافت روده مشاهده شد. همچنین به‌وسیله این روش می‌توان بافت روده ماهی را برای مدتی به حالت سالم در خارج از بدن ماهی زنده نگه داشت و با دقت به مطالعات گوناگون زیست‌شناسی، داروشناسی، دامپزشکی و غیره در بافت اپی‌تلیال روده این گونه جانوری آبری در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی پرداخت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از کمک‌های ارزشمند آقایان یداد... خسروی، نادر احمدی، آیت‌الله... حاتم پور در این پژوهش تشکر و سپاسگزاری نمایند. بدین‌وسیله از تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت مالی در انجام این تحقیق قدردانی شده و ضمناً، از دانشگاه گنت نیز در راستای انجام این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع

- Sattari, M. Ichthyology (1), Anatomy and Physiology. 1st Ed. Guilan: University of Guilan & Naghsh Mehr Pub; 2002; (In Persian).
- Nematollahi A, Shaffie S. CLASIFICATAION OF FISH with Emphasis on Iranian Fish. Tehran: Mabnaye Kherad Pub; 2010. (In Persian).
- Stoskopf M, Fish Medicine. ART Sciences LLC co; Second Edition. 2011.
- Keivany Y. Biology of Fishes. Isfahan University of Technology Pub; 2005. (In Persian).
- Bone, Q, Marshall, N.B. Biology of fishes. 2th Ed. Blackie Academic & Professional; 1995.
- Decostere A, Turnbull JF, Ducatelle R, Haesebrouck F. Development of a gill perfusion apparatus for studying the interaction of fish pathogens with gill tissue. *Altern Lab Anim: ATLA*. 2000; 28(1): 53-61.
- Decostere A, Henckaerts k, Ducatelle R, Haesebrouck F. An Alternative model to study the association of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) pathogens with the gill Tissue. *Lab Anim*. 2002; 36: 369-402.
- Evans, D.H, Claibone, J.B. The physiology of Fishes: 3th Ed. New York: CRC press; 2006.
- Lennernäs H. Human intestinal permeability. *J Pharm Sci*. 1998; 87(4): 403-410.
- Handy RD, Musonda MM, Phillips C, Falla SJ. Mechanisms of gastrointestinal copper absorption in the African walking catfish: copper dose effects and a novel anion-dependent pathway in the intestine. *J Exp Biol*. 2000; 203(15): 2365-2377.

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

از بین محلول‌های جایگزین به کار برده شده در بررسی حاضر، محلول رینگر نتوانست از بافت روده محافظت کند و ساختمان اصلی بافت روده به‌طور کامل از بین رفت، در حالی که محلول کورتلند نتوانست ساختمان اصلی روده را در زمان‌های تزریقی ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه تا حدود زیادی حفظ نماید که بسیار شبیه حالت طبیعی بافت روده (کنترل مثبت) بود (جدول ۲). تفاوت بین محلول رینگر و محلول کورتلند وجود مقدار بالای فسفات سدیم و بی‌کربنات سدیم در محلول کورتلند می‌باشد. این دو ترکیب در pH نهایی مایع تزریقی دخیل است. ضمناً pH نهایی بر روی قابلیت سالم نگه داشتن بافت روده مؤثر است. لازم به ذکر است که میزان فشار اسمزی مایع تزریقی به بافت روده نیز مهم به‌نظر می‌آید. زمانی که فشار اسمزی مایع تزریقی از فشار اسمزی بافت کمتر باشد، ادم رخ می‌دهد. البته قابلیت نفوذ پذیری سلول‌های پایه در این میان دخالت دارند. در نتیجه به‌نظر می‌آید که محلول کورتلند، محلول جایگزین مناسب‌تری از نظر فشار اسمزی در مقایسه با محلول رینگر می‌باشد.

تجمع مایع در بافت بینابینی باعث ضخیم شدن سد آبی-خونی می‌شود، در نتیجه انتقال اکسیژن از آب به خون، کاهش می‌یابد (۴ و ۵ و ۱۲). محلول رینگر + آدرنالین ضایعات شدیدی در بافت روده ایجاد نمود و بعد از گذشت ۱۸۰ دقیقه ساختار بافت روده ماهی کاملاً از بین رفت. در مقابل، محلول کورتلند + آدرنالین ضایعات خفیفی در بافت روده ایجاد نمود و ساختار روده به‌خوبی حفظ شده بود (جدول ۲).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر محلول‌های کورتلند و کورتلند + آدرنالین محلول‌های جایگزین شونده مناسبی بودند. نتایج بافت‌شناسی و میکروسکوپ الکترونی نشان داد که محلول‌های کورتلند و کورتلند + آدرنالین، پس از گذشت ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه، قادر به حفظ ساختار بافت روده ماهی بوده و تنها ادم خفیف و جدا

11. Curtis CG, Chein B, Bar-Or D, Ramu K. Organ perfusion and mass spectrometry: a timely merger for drug development. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2(1): 77-86.
12. Glover CN, Hogstrand C. In vivo characterization of intestinal zinc uptake in fresh water rainbow trout. *J Exp Biol.* 2002; 205: 141-150.
13. Kimpe A, Decostere A, Hermans K, Mast J et al. Association of *Streptococcus gallolyticus* strains of high and low virulence with the intestinal tract of pigeons. *Avian Dis.* 2003; 47: 559-565.
14. Mourad FH. Animal and human models for studying of drugs on intestinal fluid transport in vivo. *J PharmacolToxicol Methods.* 2004; 50(1): 3-12.
15. Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Ducatelle R, et al. Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dis Aquat Org.* 2003; 55:101-107.
16. Dautrey S, Felice K, Petiet A, Lacour B. Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates. *Br J Pharmacol.* 1999; 127(7): 1728-1734.
17. Evans DH. Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium. *J Exp Zool.* 2002; 293(3): 336-347.
18. MacIntyre NR. Respiratory system simulations and modelling. *Respir Care.* 2004; 49(4): 401-409.
19. Perry S.F, Davie P.S, Daxboeck C, Ellis A.G, et al. Perfusion methods for the study of gill physiology. In: Hoar WS, Randall DJ, (eds). *Fish Physiology.* London: Academic Press; 1984; 325-55
20. Roden D, Matheson PJ, Carricato ND, Spain DA, et al. Immune-enhancing enteral diet selectively augments ileal blood flow in the rat. *J Surg Res.* 2002; 106(1): 25-30.
21. Wang J, Nation RL, Evans AM, Cox S. Isolated rat kidney perfused with dextran and bovine serum albumin: A stable model for investigating renal drug handling. *J PharmacolToxicol Methods.* 2004; 49(2): 105-113.
22. Decostere A, Haesebrouck F, Turnbull JF, Charlier G. Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. 1998 *J Fish Dis.* 22(1): 1-11.
23. Rankin JC, Maetz G. A perfused teleostean gill preparation: vascular actions of neurohypophysial hormones and catecholamines. *J Endocrinol.* 1971; 51(4): 621-635.
24. Smith, DG. Sites of cholinergic vasoconstriction in trout gills. *Am J Physiol.* 1977; 233(5): 222-229.
25. Shuttleworth TJ. A new isolated perfused gill preparation for the study of the mechanisms of ionic regulation in teleosts. *CompBiochem Physiol.* 1972; 43: 59-64.
26. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London: Methuen & Co. Ltd. 1959; 26(3): 21
27. Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Ducatelle R, et al. Development of a gut perfusion model as an alternative to the use of live fish. *Lab Animal.* 2005; 39: 194-199.
28. Harper GM, Monfort M, Saoud IP, Emery M, et al. An *ex vivo* approach to studying the interactions of *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio (Listonella) anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Aquac Res Development* S1:004. Doi. 2011; 10: 4172/2155-9546.S1-004.

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

Nematollahi A. Ph.D.^{1,2*}, Nourani H. Ph.D.³, Malekian H, D.V.M²

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

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

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

* Email corresponding author: anematollahi@yahoo.com

Received: 12 Feb. 2013

Accepted: 23 Jul. 2013

Abstract

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

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

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

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

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