

مطالعه تجربی بافت‌شناسی کیفیت روند بهبود زخم در ماهی کپور

(*Cyprinus carpio*)

عیسی شریف پور

issashrifpour@yahoo.com

موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

تاریخ ورود: تیر ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۲

چکیده

این تحقیق به منظور مطالعه بافت‌شناسی مراحل پاسخ آماسی و نیز کیفیت روند بهبود زخم در پوست و عضله زخمی شده ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) به صورت تجربی و بدون دخالت عفونت ثانویه انجام شده است. سی عدد ماهی کپور آینه‌ای با متوسط طول کل ۲۲ سانتی‌متر انتخاب و در آکواریومهایی با سیستم آب مدار بسته و دمای متوسط ۲۷ درجه سانتی‌گراد مورد آزمایش قرار گرفتند. با استفاده از تیغ جراحی استریل، یک زخم جراحی استریل بدون دخالت عفونتهای ثانویه، به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر و عمق ۰/۵ سانتی‌متر بر روی عضله پشتی سمت چپ بدن ماهیهای بیهوش شده ایجاد گردید. حداقل یک ماهی زخمی شده بطور متناوب و در زمانهای ۳۰ دقیقه، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ روز بعد از ایجاد زخم کشته شده و نمونه برداری شدند. نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد و مطابق روش استاندارد بافت‌شناسی از آنها مقاطع ۵ میکرونی تهیه و به روش H&E و بعضی مقاطع خاص نیز به روش PAS + تارترازین رنگ‌آمیزی شده و سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. ترمیم بافت اپیدرمیس پوست ظرف مدت ۴ ساعت بعد از ایجاد زخم انجام شد. نفوذ ماکروفاژها به محل زخم در مدت ۲ ساعت و پاکسازی عضلات آسیب دیده توسط آنها در ۶ ساعت پس از ایجاد زخم آغاز شد. فیبرویلازی و بازسازی عضلات آسیب دیده ۲ روز پس از ایجاد زخم شروع گردید. ترمیم کامل اپیدرمیس و اتصال دوبله جدا شده درمیس پس از ۱۶ روز انجام شد. منطقه زخمی شده پوست نهایتاً پس از ۱۶ تا ۲۴ روز ساختمان اصلی و طبیعی خود را بازیافت و ترمیم شد. این تحقیق نشان داد که ماهی کپور سالم، قادر به ایجاد پاسخ آماسی سریع و مؤثر و دارای قدرت ترمیمی زیاد در برابر زخم می‌باشد.

نکات کلیدی: ماهی کپور، بهبود زخم، پاسخ آماسی، بافت‌شناسی

مقدمه

پوست و عضله ماهی نه تنها ماهی را در مقابل میزان زیادی از عفونتها محافظت می‌کند بلکه از نظر فیزیولوژیک برای ماهی و از نظر اقتصادی برای پرورش دهندگان ماهی فوق‌العاده مهم می‌باشند. پوست ماهی بعنوان نخستین سد دفاعی، نقش مهمی را نیز در تنظیم رابطه بین ماهی و محیط آن ایفا می‌کند. محیط آبی و کوتیکول پوست دارای تعداد زیادی ارگانیسم‌های بالقوه بیماریزا می‌باشند، لذا سلامت پوست ماهی بعنوان یکی از شاخص‌های اصلی برای بررسی سلامت و بهداشت ماهی در مبحث بهداشت و بیماریهای ماهی مطرح است. پی‌بردن به عکس‌العمل ماهی در مقابل صدمات و آسیب‌هایی که سلامت و تمامیت پوست ماهی را خدشه‌دار می‌کنند بسیار حائز اهمیت می‌باشد. عوامل زیادی می‌توانند سلامت پوست را زایل کنند از جمله، پارگی بوسیله اشیاء برنده، زخم‌های ناشی از انگل‌ها یا میکروبیها، زخم‌های ایجاد شده بوسیله پرندگان شکارچی، گاز گرفتن ماهی‌ها توسط یکدیگر، آفتاب سوختگی در اثر تابش اشعه UV و یا حتی دستکاری ماهی و کنده شدن فلس‌ها. ظرفیت و توانایی ماهی برای بهبود زخم و ترمیم آن به عوامل متفاوتی از جمله: شدت آسیب وارده، درجه حرارت آب، وضعیت رژیم غذایی، عوامل استرس‌زا و... بستگی دارد. بهبود زخم پوست ماهی با توجه به اینکه در محیطی با فشار اسمزی مختلف و آلوده به انواع میکروارگانیسم‌های بیماریزای فرصت طلب قرار دارند دارای اهمیت حیاتی است (Roubal & Bullock, 1988).

چگونگی پاسخ آماسی به عوامل آسیب‌رسان و مدت زمان لازم برای ترمیم زخم در ماهی توسط محققین زیادی در گونه‌های مختلف ماهی بررسی و مطالعه شده است. Finn & Nielson در سال ۱۹۷۱، Mawdesley-Thomas & Bucke در سال ۱۹۷۳، Roberts و همکاران در سال ۱۹۷۳، Mittal & Munshi در سال ۱۹۷۴، Anderson & Roberts در سال ۱۹۷۵، Roberts & Bullock در سال ۱۹۷۶، Phromsuthirak در سال ۱۹۷۷، Mittal و همکاران در سال ۱۹۷۸، Hickey در سال ۱۹۸۲، Bereiter-Hahn در سال ۱۹۸۶، Roubal & Bullock در سال ۱۹۸۸، Chinabut در سال ۱۹۸۹ و Bullock & Roberts در سال ۱۹۹۲ پاسخ آماسی بعد از زخم جراحی و مراحل بهبود زخم را در ماهیهای مختلفی مطالعه و نتایج متفاوتی را گزارش کرده‌اند. تاکنون چنین مطالعه‌ای توسط محققین

برروی ماهی کپور انجام نشده است، لذا این تحقیق بر روی ماهی کپور انجام شد تا اطلاعات بافت‌شناسی پایه‌ای و اساسی در خصوص پاسخ آماسی این ماهی در مقابل زخم و نیز مراحل مختلف، مدت زمان و قابلیت ترمیم زخم در این ماهی مشخص شود.

مواد و روش کار

سی عدد ماهی کپور آینه‌ای (*Cyprinus carpio*) با متوسط طول کل ۲۲ سانتی‌متر، حداقل بمدت ۲ هفته به منظور سازگاری در آکواریوم‌هایی با ابعاد ۱۲۲×۳۲×۴۲ سانتی‌متر و دمای متوسط آب ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ماهیهای مورد آزمایش در مدت زمان نگهداری به منظور سازگاری با محیط و نیز در دوره آزمایش تغذیه نشدند.

ماهیها با استفاده از محلول بنزوکائین ۱۰ درصد بیهوش شده و یک زخم جراحی به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر و عمق ۰/۵ سانتی‌متر با استفاده از تیغ جراحی استریل بر روی عضله پشتی سمت چپ بدن آنها ایجاد شد. بعد از ایجاد زخم، ماهیها به آکواریومها بازگردانده شده و تازمانی که برای نمونه‌گیری کشته می‌شدند تحت نظر قرار داشتند. حداقل یک ماهی زخمی شده بطور متناوب در زمانهای ۳۰ دقیقه، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ ساعت و نیز در ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ روز بعد از ایجاد زخم کشته شده و نمونه‌برداری شدند.

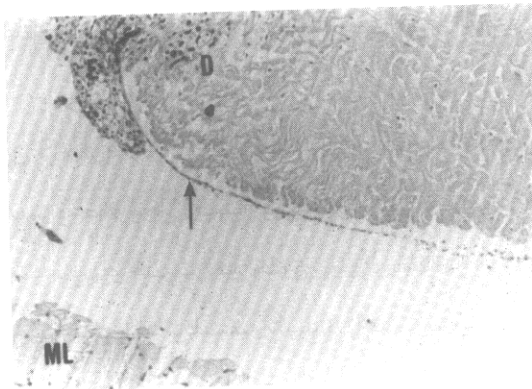
به منظور نمونه‌برداری از ماهیها، آنها را با استفاده از میزان بالای بنزوکائین کشته و سپس یک قطعه ۱/۵×۲ سانتی‌متری از پوست و عضله محل زخم به طور عمیق برداشته شد و در فرمالین ۱۰ درصد حداقل بمدت ۲۴ ساعت تثبیت شد. بافتهای تثبیت شده مطابق روشهای استاندارد بافت‌شناسی برای مقطع‌گیری آماده شدند. قبل از مقطع‌گیری، نمونه‌ها دکلسیفیه شدند تا راحت‌تر بتوان آنها را مقطع‌گیری کرد و نهایتاً مقاطع ۵ میکرونی از نمونه‌ها تهیه گردید. اکثر مقاطع میکروسکوپی تهیه شده با روش استاندارد هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و در مواردی به روش پرئودیک اسید شیف (PAS) + تارترازین رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع میکروسکوپی رنگ‌آمیزی شده، با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

نتایج

مشاهدات ماکروسکوپی نشان داد که پس از ایجاد زخم، عضلات از دو طرف منقبض شده، موجب ایجاد یک شکاف "V" شکل روی پوست گردید که بعنوان یک واکنش طبیعی نسبت به زخم منظور شد. میزان خونریزی بعد از ایجاد زخم در ماهیها متفاوت بود و عموماً بین ۲ تا ۵ دقیقه بند می‌آمد. در اولین دقایق بعد از ایجاد زخم تغییر رنگی در پوست اطراف زخم دیده نشد ولی کمتر از یک ساعت بعد از ایجاد زخم منطقه اطراف زخم روشن‌تر از رنگ طبیعی پوست شد. پس از ۲ ساعت لبه‌های زخم تیره شد و منطقه مجاور زخم رنگ روشنی به خود گرفت و منطقه دورتر رنگ طبیعی پوست را بازیافت. رنگ تیره لبه‌های زخم تا پایان آزمایش با چشم غیرمسلح قابل رویت بود. بعد از ۲ تا ۷ روز از ایجاد زخم، محل زخم مانند یک خط سفید در وسط یک منطقه تیره‌تر پوست مشاهده می‌شد.

نتایج مطالعات میکروسکوپی مراحل مختلف بهبود زخم بشرح ذیل بود:

در ۳۰ دقیقه پس از ایجاد زخم علاوه بر خونریزی وسیع و وجود اکسودا در محل زخم، تجمع ترومبوسیت‌ها نیز دیده شد. اپیدرمیس دورتر از محل زخم نازک شده و یک لایه سلولی از آن روی لبه زخم دیده شد که بنظر می‌رسید در حال مهاجرت به طرف سطح زخم می‌باشد (شکل ۱).

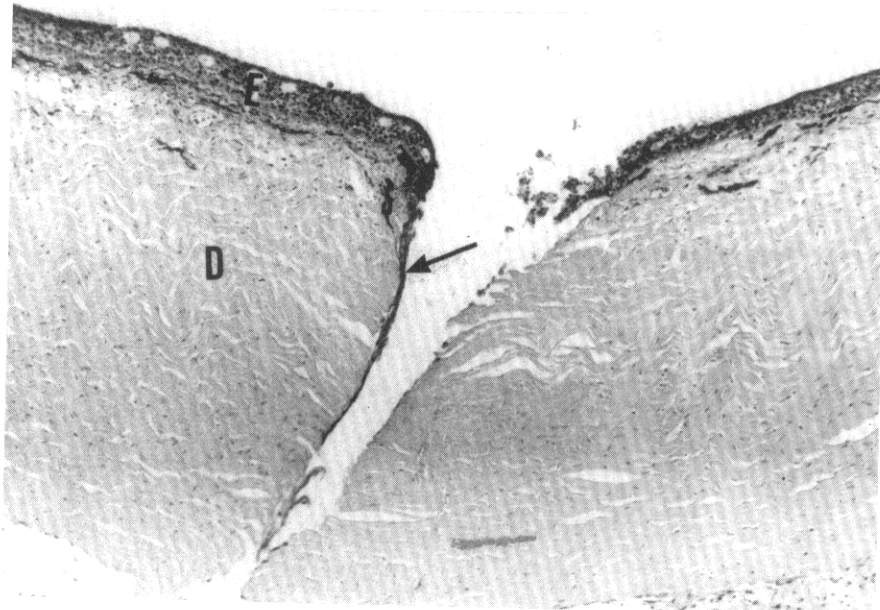


شکل ۱: ۳۰ دقیقه پس از ایجاد زخم یک لایه سلولی از اپیدرمیس (پیکان) در حال مهاجرت به طرف سطح

زخم مشاهده گردید. (۲۲۰× تارترازین + PAS)

عضله = ML درمیس = D اپیدرمیس = E

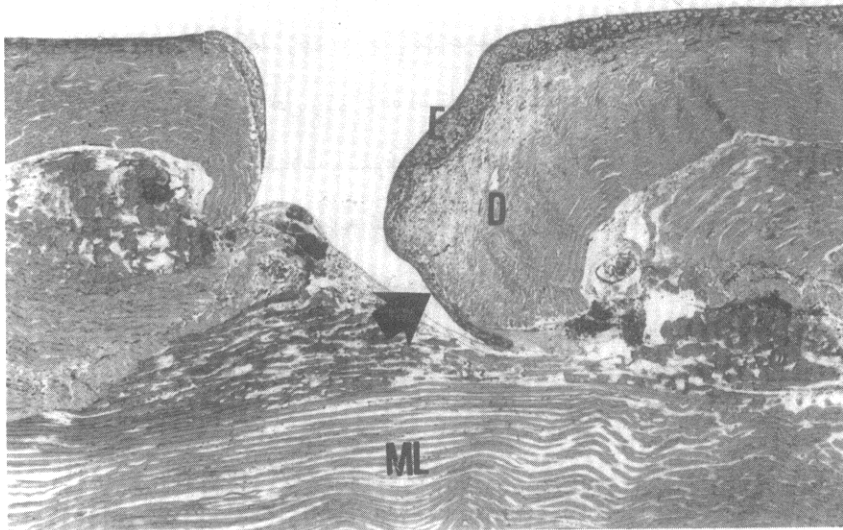
در یک ساعت پس از ایجاد زخم، ایجاد اپیدرمیس جدید در محل زخم فعال بود و سلولهای اپیدرمیسی بیشتری به طرف شکاف زخم در حال مهاجرت بودند (شکل ۲). پس از ۲ ساعت سلولهای اپیدرمیسی مهاجرت بیشتری به داخل زخم کرده (شکل ۳) و اپیدرمیس طبیعی در نزدیکی مرکز زخم ادما توز بود. همچنین دژنراسیون عضلات و نفوذ سلولهای آماسی دیده شد (شکل ۴). حضور اولین ماکروفاژها در ۲ ساعت بعد از ایجاد زخم به ثبت رسید ضمن اینکه تعدادی نوتروفیل (PMN) در منطقه‌ای که لخته فیبرین وجود داشت دیده شد. حضور لمفوسیتها و خونریزی و پرخونی رگهای خونی منطقه زخمی نیز در این مرحله مشاهده گردید.



شکل ۲: یکساعت بعد از ایجاد زخم سلولهای اپیدرمیسی بیشتری (پیکان) در حال مهاجرت به طرف شکاف زخم مشاهده شد. (۱۱۰x تارترازین + PAS)

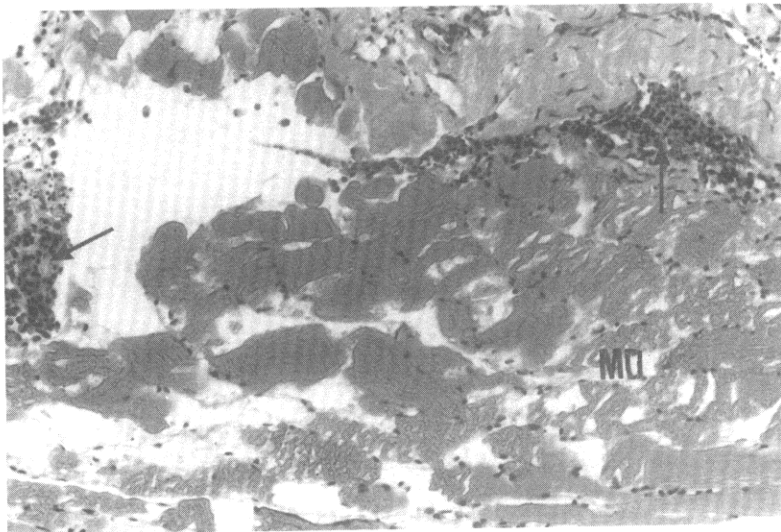
E = اپیدرمیس

D = درمیس



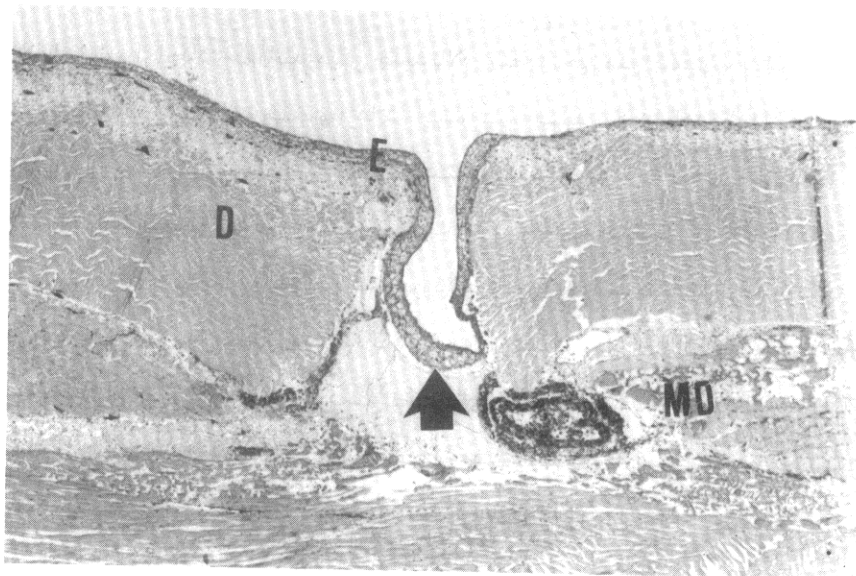
شکل ۳: تا ۲ ساعت بعد از ایجاد زخم، ایجاد درمیس جدید بصورت فعال انجام می‌شد و سلولهای اپیدرمیسی مهاجرت بیشتری را به طرف شکاف زخم نشان می‌دادند (پیکان). (H & E x ۴۴)

E = اپیدرمیسی D = درمیس ML = عضله



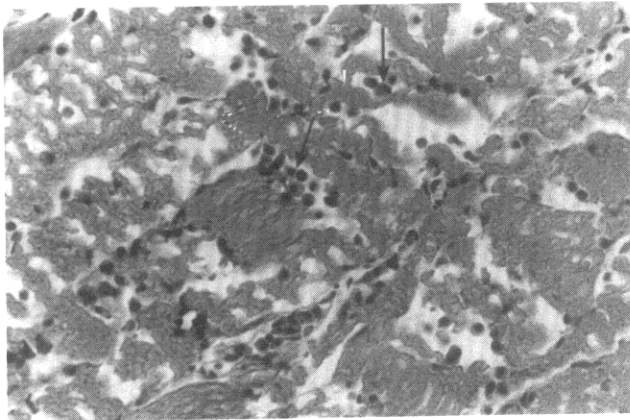
شکل ۴: این تصویر دژنراسیون عضله (MD) و حضور سلولهای آماسی (پیکان‌ها) را در منطقه زخم در ۲ ساعت بعد از ایجاد زخم نشان می‌دهد. (H & E x ۲۲۰)

در ۴ ساعت بعد از ایجاد زخم ایجاد اپیدرمیس جدید در محل زخم کامل شد که این اپیدرمیس در محل شکاف زخم ضخیم بود. هیچ لایه پایه‌ای (Basement membrane) در زیر اپیدرمیس تازه ایجاد شده دیده نشد. لایه اسفنجی درمیس ادماتوز بود و سلولهای دارای رنگدانه ملانین و سلولهای آماسی و نیز پرخونی عروق در آن دیده شد (شکل ۵). همچنین رشد مویرگهای جدید در منطقه زخم مشاهده گردید. پس از ۶ ساعت اپیدرمیس جدید در مرکز زخم ادماتوز بود و ترمیم و بازسازی لایه پایه زیر آن شروع شده بود. شروع عضله‌خواری توسط ماکروفاژها (Myophagia) همراه با افزایش تعداد ماکروفاژها و ایجاد مویرگهای خونی جدید در عضلات و لایه اسفنجی و نفوذ سلولهای آماسی از رگهای خونی مجاور مشاهده شد (شکل ۶).



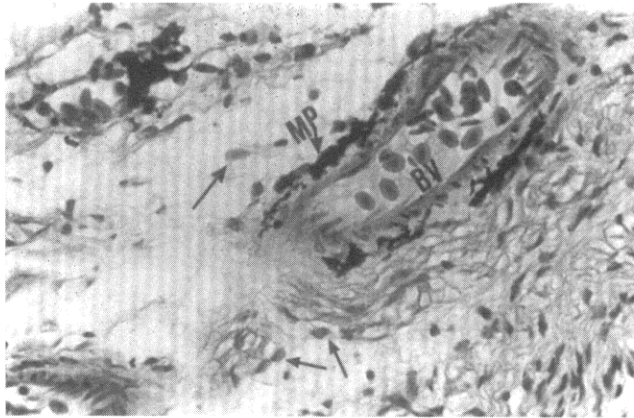
شکل ۵: بعد از ۴ ساعت از زمان ایجاد زخم، تشکیل بافت پوششی بالای شکاف زخم کامل شد (پیکان).

(H & E x ۴۴) دژنراسیون عضلات = MD درمیس = D اپیدرمیس = E

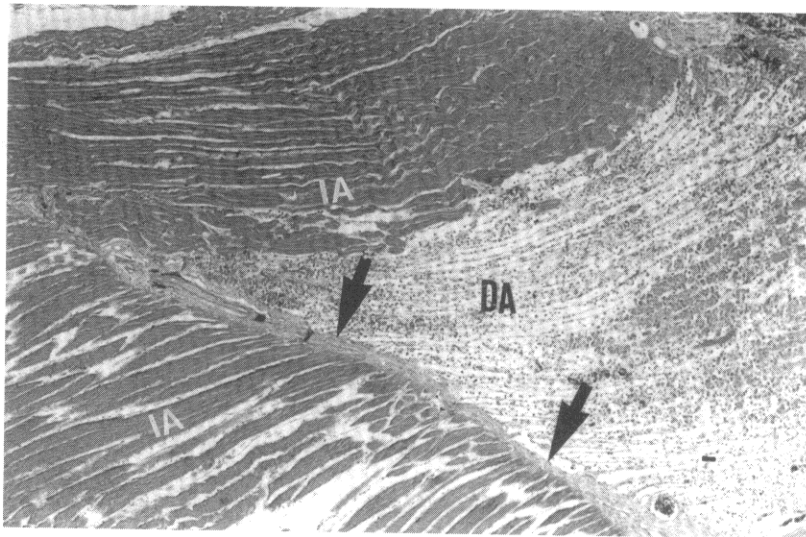


شکل ۶: این تصویر پاکسازی عضلات دژنره (Myophagia) توسط ماکروفاژها را در ۶ ساعت بعد از زخم نشان می‌دهد (پیکان‌ها). (H & E x ۴۴۰)

در ۸ ساعت بعد از ایجاد زخم، اپیدرمیس جدید بالای منطقه زخم هنوز ضخیم و ادماتوز بود. میوفاژی به صورت فعال دیده می‌شد و ماکروفاژها در اپیدرمیس جدید نیز مشاهده شدند. اولین حضور فیبروبلاستهای جدید به شکل سلولهای متورم با هسته‌های کمرنگ در لایه بین عضلانی چسبیده به میوتوم صدمه دیده مشاهده شد که مهمترین تغییرات در این مرحله بود (شکل ۷). ۷ تا ۱۲ ساعت پس از ایجاد زخم، میوفاژی خیلی فعال بود و فعالیت فیبروبلاستها نیز دیده شد. همچنین رشد مویرگهای خونی جدید در منطقه زخم به صورت فعال مشاهده گردید. یک روز بعد از ایجاد زخم ادم اپیدرمیس جدید هنوز مشخص بود و دارای تعدادی سلولهای موکوسی و سلولهای کلاب شده بود. میوفاژی فعال همراه با افزایش تعداد ماکروفاژها دیده شد. همچنین فیبرهای کوچک عضلانی که صدمه کمتری دیده بودند شروع به ترمیم نموده بودند. مقداری تولید رشته‌های فیبروز (Fibroplasia) در منطقه زخم دیده شد. مهمترین خصوصیات بهبود زخم در روز دوم بعد از ایجاد زخم، میوفاژی، فیبروبلازی و بازسازی و ترمیم عضلانی بود. سلولهای موکوسی به طور کامل در اپیدرمیس جدید ظاهر شده بودند ولی سلولهای کلاب در حد متعارف نبودند. نکته مهم در این مرحله محدود کردن انتشار زخم بوسیله لایه پری‌میزیوم بود که به وضوح دیده می‌شد (شکل ۸). در این مرحله نخستین جوانه‌های عضلانی جدید در منطقه عضلانی صدمه دیده مشاهده گردید. لایه پایه زیر اپیدرمیس جدید در ۴ روز بعد از ایجاد زخم بطور کامل ایجاد و توسعه یافته و میوفاژی پایان یافته و کامل شده بود (شکل ۹).



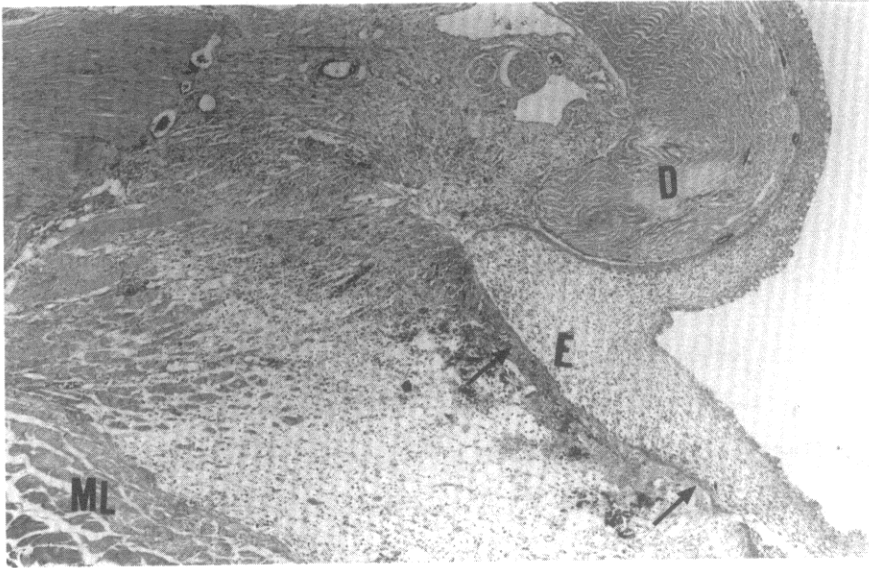
شکل ۷: اولین حضور فیبروبلاستها با هسته‌های رنگ پریده (پیکان‌ها) در لایه نازک بین عضلانی، مجاور عضله صدمه دیده در ۸ ساعت پس از زخم، نشانگر آغاز فعالیت فیبروبلاستهاست. عروق خونی (BV) در این مرحله همراه با حضور رنگدانه ملانین در اطراف آنها (MP) دیده می‌شوند.
(H & E x ۴۴۰)



شکل ۸: دو روز بعد از ایجاد زخم، پریمیژیوم بعنوان سدّی نگهدارنده در محدود کردن انتشار زخم عمل نمود (پیکان‌ها). (H & E x ۴۴)

DA = منطقه صدمه دیده

IA = منطقه سالم



شکل ۹: اپیدرمیس جدید (E) بالای منطقه زخم در ۴ روز پس از زخم ضخیم و ادماتوز بود. لایه پایه در زیر اپیدرمیس جدید (پیکانها) کاملاً توسعه یافته و میوفاژی نیز کامل شده است. (H & E x ۴۴)

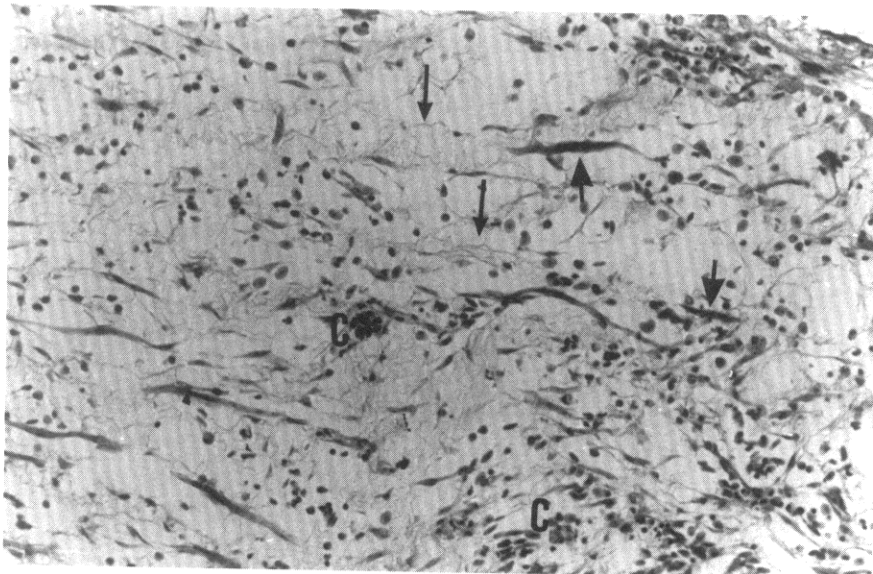
D = درمیس

ML = عضلات

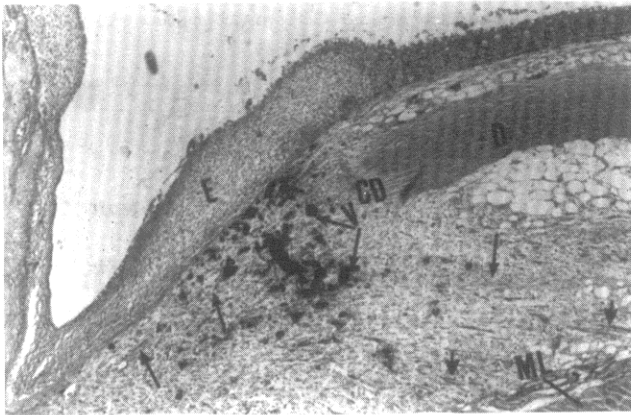
فیبروپلازی و فیبروزیس از خصوصیات بارز ترمیم زخم در این مرحله بود. تعداد زیادی از فیبرهای عضلانی جدید و نیز جوانه‌های جدید عضلانی در منطقه‌ای از زخم که بافت فیبروزه جایگزین شده بود دیده شد که بیشتر نزدیک به مناطق عضلات سالم بودند و مناطق فعال بیشتری از بافت فیبروزه دارای عروق خونی شده بودند (شکل ۱۰). در ۶ روز پس از ایجاد زخم لبه‌های جدا شده درمیس بطور محسوسی بوسیله یک رشته بافت فیبروزه فعال شروع به متصل شدن نموده بود. در تمام منطقه زخم تشکیل کلاژن و بافت فیبروزه بطور فعال دیده می‌شد که همراه با تشکیل عروق خونی مخصوصاً بین دو لبه جدا شده درمیس در زیر منطقه اپیدرمیس جدید بود (شکل ۱۱). همچنین ترمیم فعال عضلانی و ایجاد رشته‌های جدید عضلات دیده شد. لایه رنگدانه ملانین بطور مشخص و واضح در زیر قسمت ابتدایی اپیدرمیس جدید مجاور اپیدرمیس طبیعی مشاهده گردید. اپیدرمیس جدید در ۸ روز بعد از ایجاد زخم تقریباً شبیه اپیدرمیس طبیعی بود و روپهم افتادگی اپیدرمیس جدید تقریباً طبیعی شده بود. لایه رنگدانه ملانین در

زیر لایه پایه اپیدرمیس جدید و مقداری نیز در بافت فیبروزه جدید بطور مشخصی توسعه پیدا کرده بود (شکل ۱۲). لبه‌های جدا شده درمیس بطور واضح‌تری بوسیله بافت فیبروزه به یکدیگر متصل شده بودند و رشد میوفیبریل‌های جدید در داخل بافت فیبروزه به وضوح دیده می‌شد. پیشرفت نرمیم و بازسازی پوست و عضله آسیب دیده در ۱۶ روز پس از ایجاد زخم تقریباً کامل شده بود.

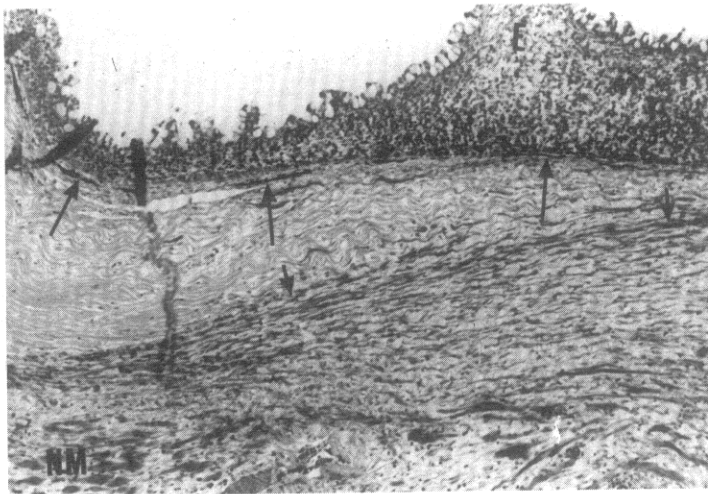
منطقه عضلانی صدمه دیده نیز بوسیله بافت فیبروزه جایگزین گردیده بود. دولبه جداشده درمیس کاملاً به یکدیگر نزدیک شده و بهم متصل شده بودند. توسعه میوفیبریل‌های جدید در منطقه صدمه دیده مشاهده شد. همچنین لایه‌ای از ملانین در زیر تمام اپیدرمیس جدید و نیز در بافت فیبروزه بین دو لبه جدا شده درمیس دیده شد.



شکل ۱۰: این تصویر رشته‌های کوچک عضلانی نوسازی شده را (پیکان‌های کوتاه) همراه با فیبروزیس (پیکان‌های بلند) و مویرگهای خونی جدید (C) در منطقه زخم در ۴ روز پس از ایجاد زخم نشان می‌دهد. (H & E x ۲۲۰)

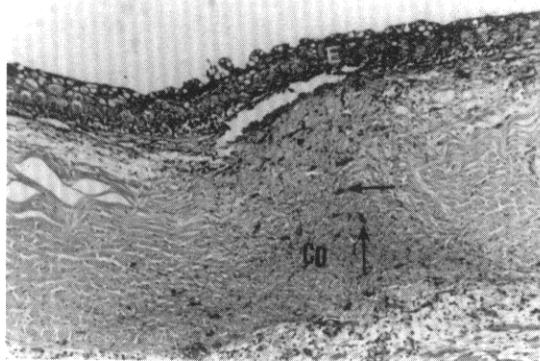


شکل ۱۱: در ۶ روز پس از زخم، اپیدرمیس جدید (E) در بالای منطقه زخم هنوز ادماتوز و ضخیم‌تر است. لبه‌های بریده شده درمیس (CD) به میزان کمی شروع به اتصال نموده است. بازسازی فعال عضلات (پیکان‌های کوتاه)، فیبروزیس (پیکان‌های بلند) و تولید عروق خونی (V) در این مرحله آشکار است. (H & E x ۴۴) D = درمیس ML = عضله

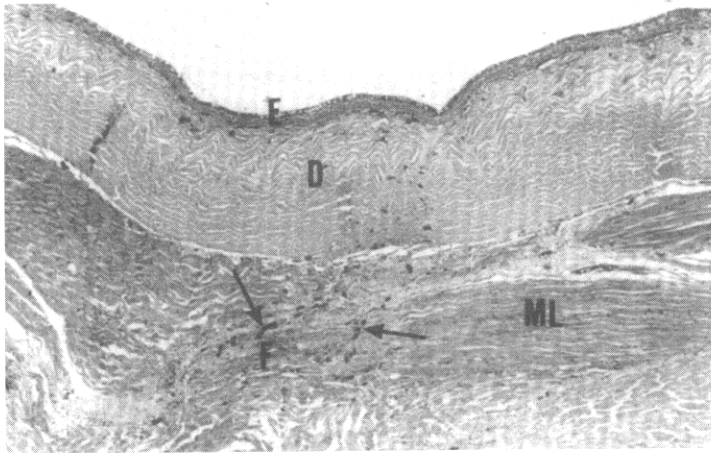


شکل ۱۲: پیشرفت مشخصی از لایه ملانین (پیکان‌های بلند) بلافاصله زیر اپیدرمیس جدید (E) در ۸ روز بعد از ایجاد زخم مشاهده می‌شود. لبه‌های بریده درمیس بوسیله بافت فیبروز فعال اتصال بیشتری پیدا کرده است (پیکان‌های کوتاه). همچنین رشد عضلات جدید (NM) واضح و مشخص است. (H & E x ۱۱۰)

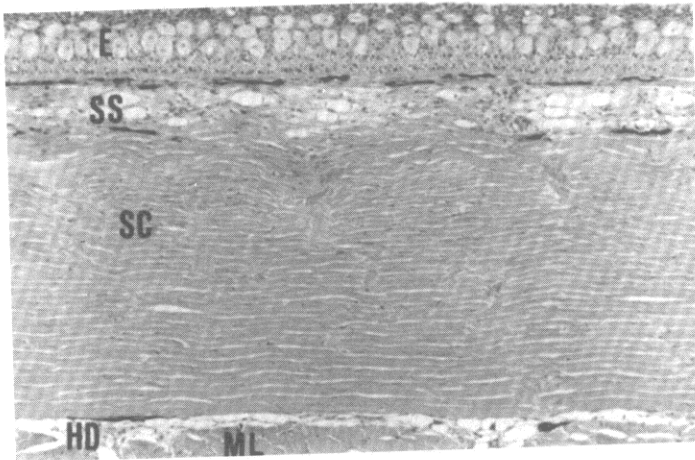
در روز بیست و چهارم بعد از ایجاد زخم اپیدرمیس تقریباً بطور کامل ترمیم شده بود ولی سلولهای کلاب در قسمت بالای بافت فیبروزه در درمیس و مناطق عضلات صدمه دیده هنوز به تعداد طبیعی خود نرسیده بودند. درمیس بطور کامل و محکم بهم متصل شده بود ولی هنوز قسمت کوچکی از بافت فیبروزه بین دو لبه جدا شده درمیس وجود داشت. تمام منطقه صدمه دیده زیر درمیس بوسیله دستجات عضلانی جدید و بافت فیبروزه پر شده بود. رنگدانه‌های ملانین در منطقه صدمه دیده درمیس و نیز منطقه جایگزین شده بوسیله بافت فیبروزه پراکنده بود (شکل ۱۳). ۳۲ روز پس از ایجاد زخم، مراحل بهبود زخم شبیه روز بیست و چهارم بود با این تفاوت که ترمیم منطقه صدمه دیده پیشرفت بیشتری داشت (شکل ۱۴). سه مرحله آزمایش در روزهای ۴۰ و ۵۰ و ۶۰ بمنظور تحقیق در چگونگی پیشرفت تکمیل سلولهای کلاب از نظر تعداد و نیز درجه اتصال اپیدرمیس جدا شده در منطقه زخم در مراحل آخر بهبود زخم انجام شد. سلولهای کلاب در اپیدرمیس در هر مرحله از این ۳ مرحله آزمایش از نظر تعداد افزایش بیشتری نسبت به مرحله قبل نشان می‌داد بنحوی که در ۶۰ روز بعد از ایجاد زخم اپیدرمیس کاملاً طبیعی بود. اتصال دو لبه جدا شده درمیس نیز در هر مرحله قوی‌تر و محکم‌تر از مرحله قبل بود ولی حتی تا آخرین مرحله از آزمایش، درمیس در منطقه صدمه دیده شکل کاملاً طبیعی خود را باز نیافت. اشکال ۱۵ و ۱۶ وضعیت طبیعی پوست ماهی کپور آینه‌ای را قبل از ایجاد زخم به منظور مقایسه با پوست ترمیم یافته بعد از ایجاد زخم نشان می‌دهند.



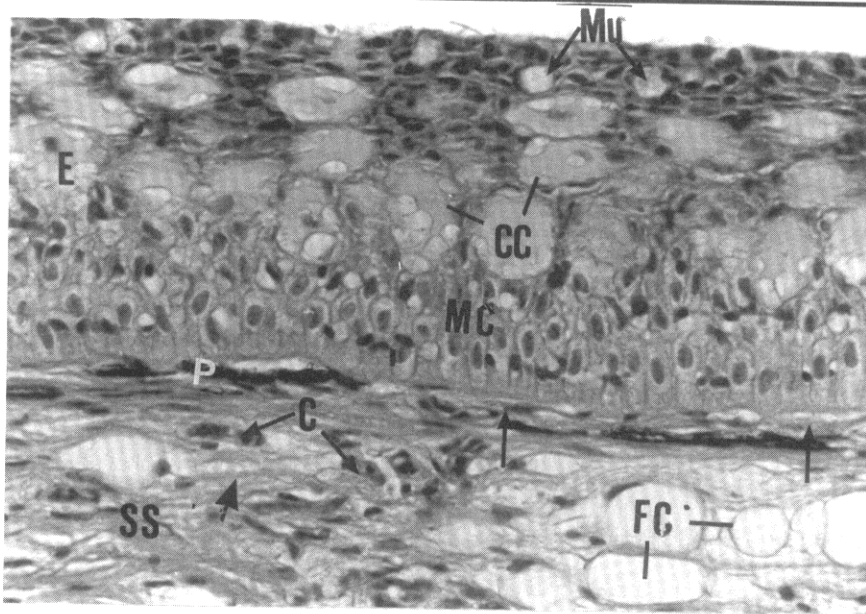
شکل ۱۳: بعد از ۲۴ روز، تشکیل اپیدرمیس جدید (E) پیشرفت زیادی نموده و درمیس جدا شده (CD) کاملاً بهم متصل شده است. رنگدانه‌های ملانین (پیکان‌ها) در درمیس تازه پیوند خورده و نیز منطقه عضلات پراکنده‌اند. (H & E x ۱۱۰)



شکل ۱۴: تصویر زخم بعد از ۳۲ روز نشان‌دهنده تکمیل اپیدرمیس (E) و درمیس (D) است بنحوی که شبیه به پوست نرمال می‌باشد. رشته‌های عضلانی بازسازی شده (ML) منطقه زخم را پر کرده است. منطقه کوچکی که بافت فیبروزه در آن جایگزین شده (F) با رنگدانه‌های ملانین پراکنده (پیکان‌ها) در این تصویر مشخص است. (H & E x ۴۴)



شکل ۱۵: پوست طبیعی ماهی کپور آینه‌ای قبل از ایجاد زخم. (H & E x ۱۱۰)
 اپیدرمیس = E، لایه اسفنجی درمیس = SS، لایه فشرده درمیس = SC،
 هیپودرمیس = HD، عضلات زیر جلدی = ML



شکل ۱۶: این تصویر بزرگنمایی شکل ۱۵ می باشد که قسمت اپیدرمیس و لایه اسفنجی درمیس پوست

طبیعی ماهی کپور آینه‌ای را نشان می دهد. (H & E x ۴۴۰)

اپیدرمیس = E، لایه اسفنجی درمیس = SS، سلولهای موکوسی = Mu، سلولهای کلاب = CC، سلولهای مالپیگی = MC، لایه پایه = پیکانهای بلند، سلولهای رنگدانه = P، مویرگها = C، سلولهای چربی = FC، شبکه کلاژنی سست = پیکان کوتاه

بحث

بررسیهای ماکروسکوپی زخم نشان داد که تغییراتی در رنگ پوست پس از ایجاد زخم بوجود می آید. چنین تغییراتی ممکن است بواسطه انتشار غیرفعال رنگدانهها باشد (Mittal & Munshi, 1974) که تحت کنترل عصبی (Sage, 1970; Roberts, 1975) یا تخریب کنترل ملانوفورها (Laird *et al.*, 1975) ایجاد می شود. این تغییر رنگ مشابه تغییر رنگی است که در پوست زخمی شده ماهیان Snakehead (Chinabut, 1989) ; Catfish (Mittal *et al.*, 1978 ; Mittal & Munshi, 1974) Salmon (Roberts *et al.*, 1971) گزارش شده است.

یکی از مهمترین و جالبترین مراحل بهبود زخم، مرحله سریع ترمیم بافت اپی تلیوم پوست است. پس

از ایجاد زخم، سلولهای پوششی پوست از دو طرف محل زخم شروع به مهاجرت از محل خود به طرف شکاف زخم نمودند که این مهاجرت منجر به اتصال اپیدرمیس جدا شده پوست و پوشیده شدن شکاف زخم گردید. این موضوع با نتایج تحقیقات (Quilhac & Sire, 1999) که بر روی ماهی *Cichlid* انجام شد مطابقت دارد. ترمیم اپیدرمیس جدا شده در این تحقیق ظرف ۴ ساعت بعد از ایجاد زخم انجام شد. جدول یک زمان لازم جهت ترمیم اپیدرمیس در گونه‌های مختلف ماهی را نشان می‌دهد. (Mittal & Munshi, 1974) و همچنین (Hickey, 1982) نسبت ترمیم اپیدرمیس را با ضخامت اپیدرمیس مرتبط دانسته‌اند و پیشنهاد کرده‌اند که چنانچه اپیدرمیس ضخیم باشد ترمیم اپیدرمیس محل زخم می‌تواند سریعتر از اپیدرمیسی که نازک است صورت پذیرد، لیکن نتایج حاصل از این تحقیق در ماهی کپور در مقایسه با گونه‌های دیگر چنین نظریه‌ای را تأیید نمی‌کند. ضخامت پوست ماهیان آزمایش شده در این تحقیق بطور متوسط ۹۵ میکرون بود و ترمیم اولیه اپیدرمیس محل زخم ظرف ۴ ساعت بعد از ایجاد زخم انجام شد در حالیکه بعنوان نمونه در ماهی *Rita rita* با میانگین ضخامت پوست ۴۹۰ میکرون ظرف ۴ تا ۶ ساعت (Mittal & Munshi, 1974) و ماهی *Misgurnus fossilis* با میانگین ضخامت پوست ۳۳۸/۷ میکرون ظرف ۱۲ ساعت بعد از ایجاد زخم ترمیم اولیه اپیدرمیس انجام شد (Van Oosten, 1957). بسته شدن شکاف زخم بوسیله ترمیم سریع اپیدرمیس عامل مهمی در کمک به کاهش از دست دادن مایعات، پروتئین و یونها از طریق زخم و همچنین محدود کردن ورود عوامل بالقوه بیماریزا می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مهاجرت سلولهای پوششی به طرف محل شکاف زخم با استفاده از اکسودای فیبرینی موجود در محل زخم بعنوان یک بستر صورت می‌گیرد. همچنین در زمان مهاجرت سلولها به طرف محل زخم، اپیدرمیس موجود در فاصله‌ای دورتر از محل اصلی زخم نازک شده و سلولهای مالپیگی موجود در آن به صورت کشیده در آمده که احتمالاً در تسهیل مهاجرت آنها می‌تواند موثر باشد. این یافته‌ها نتایج مطالعات دیگری که قبلاً در خصوص ترمیم اپیدرمیس در گونه‌های دیگر ماهی انجام شده را تأیید می‌کند. بهر حال ترمیم بافت پوششی محل زخم در ماهی کپور مورد آزمایش نسبت به اکثر گونه‌های آزمایش شده سریعتر است (جدول ۱).

جدول ۱: زمان مورد نیاز برای ترمیم بافت پوششی آسیب دیده در ماهیهای مختلف

جنس و گونه ماهی	زمان لازم	درجه	اندازه	منابع
	برای ترمیم (ساعت)	حرارت (سانتیگراد)	زخم (میلیمتر)*	
<i>Misgurnus fossilis</i>	۱۲	NA	NA	Van Oosten, 1957
<i>Cobistis taenia</i>	۲۴	NA	NA	Kudokotsev & Silkima, 1967
<i>Protopterus annectens</i>	۲۴	۲۱	NA	Conant, 1970
<i>Protopterus aethiopicus</i>				
<i>Rita rita</i>	۴-۶	NA	۵ × ۲-۳	Mittal & Munshi, 1974
<i>Salmo salar</i>	۳	۲۳	۴/۵ × ۱	Anderson & Roberts, 1975
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	۷۲	NA	۱/۳ × ?	Phromsuthirak, 1977
<i>Pleuronectes platessa</i>	۹	۱۰	۵ × ۱	Bullock <i>et al.</i> , 1978b
	۱۲	۵	۵ × ۱	
	۱۲	۱۵	۵ × ۱	
<i>Heteropneustes fossilis</i>	۴	NA	۵ × ۲-۳	Mittal <i>et al.</i> , 1978
<i>Pleuronectes Platessa</i> (Larvae)	۴-۱۲	۱۰-۱۱	۰/۱-۶/۶mm ²	Hickey, 1982
<i>Clupea harengus</i> (Larvae)	۴-۶	۱۰-۱۱	۰/۴-۰/۶mm ²	Hickey, 1982
<i>Salmo salar</i> (Larvae)	۴-۸	۱۰-۱۱	۰/۶-۱/۲mm ²	Hickey, 1982
<i>Mystus vittatus</i>	۵	NA	۴ × ۲	Saxena & Kulshrestha, 1982
<i>Salmo salar</i>	۴	NA	NA	Rai & Mittal, 1983
<i>Oreochromis niloticus</i>	۵	۲۸	۴ × ۲	Jauncey <i>et al.</i> , 1985
<i>Salmo salar</i>	۸	۴	۲-۳ × ?	Roubal & Bullock, 1988
<i>Channa striatus</i>	۲	۲۸	۵ × ۳	Chinabut, 1989
<i>Salmo salar</i>	۱۲	NA	۵ × ۱	Bullock & Roberts, 1992
<i>Cyprinus carpio</i>	۴	۲۷	۱۵-۲۰ × ۵	تحقیق حاضر

* = عمق × طول ؟ = نویسنده (گان) مشخص نکرده اند NA = غیر قابل دسترس

درجه حرارت محیط از عوامل مهمی است که تأثیر مستقیم در مهاجرت سلولها و میزان ترمیم بافت پوستی آسیب دیده دارد (Bullock *et al.*, 1978; Anderson & Roberts 1975; Roberts *et al.*, 1971). بنابراین میزان سریع ترمیم بافت پوستی در ماهی کپور در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد را می‌توان قابل توجه دانست. لایه باید در زیر اپیدرمیس جدید، تا قبل از بسته شدن شکاف زخم در ۲ ساعت بعد از ایجاد زخم، دیده نشد. پس از این زمان این لایه شروع به ایجاد و رشد نمود و ظرف ۲ تا ۴ روز بعد از ایجاد زخم کامل شد. لایه باید نقش مهمی در استحکام پوست و نیز نقش فیزیولوژیک مهمی در هومئوستازی محیط داخل بدن در محیطهای هیپوتونیک و هیپرتونیک بازی می‌کند (Roberts *et al.*, 1970; Bullock & Roberts, 1975).

سلولهای کلاب (Club Cells) در این تحقیق آخرین نوع سلولهای بودند که در پوست ترمیم شده ظاهر شده، توسعه یافته و از نظر تعداد کامل شدند. ظهور دیر هنگام این سلولها در زمان لاروی ماهی و نیز ترمیم بافت پوستی بعد از ایجاد زخم نشان می‌دهد که ممکن است نقش آنها در مکانیسم‌های دفاعی و حفاظتی کمتر از سلولهای مالپیگی یا سلولهای موکوسی باشد (Mittal & Munshi, 1969).

اتصال لبه‌های جدا شده درمیس بطور خفیفی در ۶ روز پس از ایجاد زخم شروع شد و این اتصال پس از ۱۶ روز توسط بافت فیبروزه کامل شد. ماهیهای مورد آزمایش در این مطالعه در طول دوره آدپتاسیون و دوره آزمایش تغذیه نشدند. Halver (1972) نشان داده است که ویتامین C یک عامل تسهیل کننده (co-factor) لازم برای تشکیل کلاژن در ترمیم زخم‌ها است. همچنین Alexis و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که پاسخ بهبود زخم ارتباط مستقیمی با سطح آسکوربایت (ascorbate) در جیره غذایی ماهی *Gilthead bream (Sparus aurata)* دارد. ماهیان آزمایشی در این تحقیق با وجودیکه تغذیه نشدند و لذا ویتامین C دریافت نکردند، از نظر ترمیم درمیس در مقایسه با سایر ماهیانی که در تحقیقات دیگری توسط محققین دیگر استفاده شده‌اند و در زمان آزمایش تغذیه می‌شده‌اند دارای زمان ترمیم قابل قبولی بوده‌اند. با ترمیم تدریجی درمیس که نقش مهمی را در استحکام و قوام پوست و نیز حفاظت بدن بازی می‌کند، ضخامت و روپهم افتادگی اپیدرمیس جدید در مراحل مختلف بهبود زخم، کاهش یافت. بهرحال

ترمیم کامل و بازیافتن ساختمان طبیعی درمیس ممکن است بیش از یکسال طول بکشد که این امر بستگی به درجه حرارت محیط ماهی دارد (ارتباط شخصی (R.J.Roberts).

ماکروفاژها در ۲ ساعت بعد از ایجاد زخم در عضلات آسیب دیده مشاهده شدند و میوفاژی فعال در ۶ ساعت بعد از ایجاد زخم آغاز گردید. با توجه به نقش مهم ماکروفاژها در ترمیم زخم، حضور و فعالیت آنها در این مطالعه در مقایسه با اکثر ماهیهای دیگری که مورد آزمایش مشابه قرار گرفته‌اند سریعتر بود. اولین حضور سلولهای فیبروبلاست جدید که مسئولیت تولید رشته‌های کلاژن و ایجاد بافت همبندی در محل زخم را دارند در ۸ ساعت بعد از ایجاد زخم اتفاق افتاد که این امر در مقایسه با بعضی از دیگر ماهیان نسبتاً سریع می‌باشد. حداکثر پیشرفت تشکیل بافت گرانوله ۴ تا ۶ روز بعد از ایجاد زخم بود که در مدت ۴ تا ۱۶ روز بوسیله رشته‌های جدید عضلانی جایگزین شدند. در این مطالعه تشکیل جوانه‌های جدید عضلانی و ترمیم و بازسازی رشته‌های عضلانی آسیب دیده در ۲ روز بعد از ایجاد زخم مشاهده شد که این زمان سریعتر از زمانی است که در ماهی ریتا ریتا (Mittal & Munshi, 1974)، سالمون (Anderson & Roberts, 1975)، گربه ماهی (Mittal et al., 1978) و تیلاپیا (Jauncey et al., 1985) گزارش شده است ولی کندتر از زمانی است که در ماهی Snakehead در ۲۸ درجه سانتی‌گراد توسط Chinabut (1989) گزارش گردیده است. ترمیم عضلانی منطقه زخم در ماهی کپور در این تحقیق ظرف ۱۶ روز کامل شد. لازم به ذکر است که میزان ترمیم عضلانی و درجه حرارت محیط کاملاً بهم مرتبط می‌باشند.

در این مطالعه حضور رنگدانه‌های ملانین در منطقه صدمه دیده در ۸ ساعت و توسعه لایه ملانین در زیر لایه پایه اپیدرمیس جدید و بافت فیبروزه ظرف ۸ روز بعد از ایجاد زخم مشاهده شد. پس از آن با پیشرفت روند بهبود زخم رنگدانه‌های ملانین در منطقه بهبود زخم گسترش و افزایش یافت. رنگدانه‌ها در اکثر زخم‌های پوست نقش دارند. حضور رنگدانه‌ها در مدت کوتاهی بعد از ایجاد زخم در زیر اپیدرمیس جدیدی که نسبت به انواع صدمات بسیار آسیب‌پذیر می‌باشد و بعد از ایجاد زخم تشکیل می‌شود مؤید این نکته است (Roberts, 1975). علاوه بر نقش ملانین‌ها در اختفاء ماهی، (Edelstein (1971) گزارش کرده

است که ملانین و رنگدانه‌های مربوطه بدلیل استعداد تولید H_2O_2 نقش دفاعی در بیشتر ارگانیسم‌ها بازی می‌کنند. علاوه براین، ملانین‌ها در مکانیسم کشتن باکتریها (Ellis, 1981) و جلوگیری از نفوذ اشعه ماوراء بنفش (UV) از اپیدرمیس جدید بداخل منطقه تازه بهبود یافته زخم، نقش مهمی دارند (ارتباط شخصی R.J.Roberts).

در این مطالعه، ایجاد عروق خونی جدید در ۶ ساعت بعد از ایجاد زخم شروع شد که همراه با بهبود و بسته شدن زخم، مویرگها بتدریج کاهش پیدا کرده و در مراحل انتهائی بهبود زخم یافتن آنها در منطقه زخم بسیار مشکل بود. ظهور نسبتاً سریع مویرگهای خونی در منطقه زخم در ماهی کپور نقش مهمی در سرعت بخشیدن به انجام مراحل بهبود زخم دارد. این امر می‌تواند باعث مهاجرت سریع و فعال سلولهای دفاعی به منطقه زخم شده تا از هجوم باکتریها به بافتهای زیرین اپیدرمیس و نیز جذب سموم جلوگیری کنند، ضمن اینکه موجب تغذیه سلولهای ترمیمی فعال در منطقه زخم نیز می‌شوند.

در تحقیقاتی که توسط Wagner و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد نشان دادند که ضد عفونی کردن زخم ایجاد شده در ماهی قزل‌الای رنگین کمان با ضد عفونی کننده پووایدین - آیودین (Povidine-iodine) پیشرفتی در بهبود زخم نداشت و میزان بهبودی را تغییر نداد و زخم پس از ۴۲ روز بهبود یافت. دهقانی و همکاران (۱۳۷۶) در بررسی کلینیکی ترمیم زخم در دیواره بطنی ماهی کپور معمولی نشان دادند که چنانچه از نخ پلی گلیکولیک برای بخیه زخمهای ایجاد شده استفاده شود التهاب بافتی نسبت به نخ‌های کات کوت ساده و کرومیک کمتر بوده و سطح زخمها هموارتر است. آنها استفاده از نخ پلی گلیکولیک را برای جراحی‌های ماهی ارجح دانستند. شاهسونی و همکاران (۱۳۸۰) با مقایسه اثر دوداروی اکسیدروی و فنی توئین سدیم بر التیام زخم‌های جلدی ناشی از برش جراحی در ماهی قرمز به این نتیجه رسیدند که فنی توئین سدیم موضعی باعث تسریع روند التیام زخم می‌شود. همچنین شاهسونی و همکاران (۱۳۸۱) در تحقیق دیگری اثرات التیامی ویتامین A و فنی توئین سدیم را در ضایعه جلدی ماهی قرمز بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که فنی توئین سدیم روند التیام زخم را نسبت به ویتامین A بیشتر تسریع می‌نماید و بازسازی بافت پوششی محل ضایعه سریعتر انجام می‌گیرد.

یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ماهی کپور سالم بدون بخیه زدن و یا استفاده از داروهای التیام زخم قادر به ایجاد پاسخ آماسی بسیار سریع و موثر و همچنین التیام و بهبود زخم در مدت زمان معینی می‌باشد. از آنجا که پاسخ آماسی، مکانیسم اساسی حفاظت بافت از صدمات وارده به هر علتی می‌باشد و همچنین به دلیل وقوع مکرر آن در اکثر بیماریها و نیز نقش حفاظتی آن، می‌توان آن را به عنوان جنبه بنیادی و اساسی آسیب‌شناسی دانست.

تشکر و قدردانی

از پروفسور Ronald J. Roberts استاد ممتاز آسیب‌شناسی ماهی انستیتو آبی‌پروری دانشگاه استرلینگ انگلستان به خاطر راهنمایی‌های بسیار ارزنده‌شان در طول انجام این تحقیق صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

از سرکار خانم فاطمه قریشی و سرکار خانم اکرم‌السادات موسوی بدلیل تایپ مقاله سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- دهقانی، س.؛ ملکی، م. و اکبری، س.، ۱۳۷۶. بررسی کلینیکی ترمیم زخم در دیواره بطنی ماهی کپور معمولی. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۴، سال ششم، صفحات ۸۷ تا ۹۴.
- شاهسونی، د.؛ موثقی، الف.ر. و صاحبی، غ.ح.، ۱۳۸۰. بررسی مقایسه‌ای اثرات التیامی اکسید روی و فنی توئین سدیم در ضایعات جلدی ماهی قرمز. مجله پژوهش و سازندگی، ۵۲.
- شاهسونی، د.؛ موثقی، الف.ر. و صاحبی، غ.ح.، ۱۳۸۱. بررسی مقایسه‌ای اثرات التیامی ویتامین A و فنی توئین سدیم در ضایعات جلدی ماهی قرمز. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۷.
- شریف پور، ع.، ۱۹۹۷. بافت‌شناسی پاسخ آماسی ماهی کپور به محرکهای مختلف. پایان نامه دکترای تخصصی (Ph.D) دانشگاه استرلینگ، اسکاتلند. ۳۷۶ صفحه.

- Alexis, M.N. ; Karanikolas, K.K. and Richards, R.H. , 1997. Pathological findings owing to the lack of ascorbic acid in cultured gilthead bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. Vol. 151, No.1-4, pp.209-218.
- Anderson, C.D. and Roberts, R.J. , 1975. A comparison of the effects of temperature on wound healing in a tropical and a temperate teleost. Journal of Fish Biol. Vol.7, pp.173-182.
- Bereiter-Hahn, J. , 1986. Epidermal cell migration and wound repair. In: Biology of the integument. Vol.2- Vertebrates. (eds.) J. Bereiter - Hahn, A.G. Matoltzy and K.S. Richards. Heidelberg:Springer. pp.443-471.
- Bullock, A.M. ; Marks, R. and Roberts, R.J. , 1978. The cell kinetics of teleost fish epidermis: Epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*).Journal of Zool. London. Vol. 185, pp.197-204.
- Bullock, A.M. and Roberts, R.J. , 1975. The dermatology of marine teleost fish.I.The normal integument. Oceanogr.Mar.Biol.Ann.Rev. Vol. 13, pp.383-411.
- Bullock, A.M. and Roberts, R.J. , 1992. The influence of ultraviolet-B radiation on the mechanism of wound repair in the skin of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Journal of Fish Diseases. Vol. 15, pp.143-152.
- Chinabut, S. , 1989. Studies on the inflammatory response of the striped snakehead (*Channa striatus* Fowler). ph.D.Thesis. University of Stirling, Scotland, 247 P.
- Conant, E.B. , 1970. Regeneration in the African Lungfish, *Proterus*.I. Gross aspects. Journal of Exp. Zool. Vol. 174, pp.15-32.

- Edelstein, L.M. , 1971. Melanin: a unique biopolymer. *In: pathobiology Annual*,(ed.) H.L. Joachim, New York: Appleton- Century- Crofts. pp.309-324.
- Ellis, A.E., 1981. Non-specific defence mechanism in fish and their role in disease process. *In: developments in biological standardization, International Symposium on Fish Biology.* (ed.) D.P. Anderson and W. Hennesen. Basel, Switzerland. Vol.49, pp.337-352.
- Finn, J.P. and Nielson, N.O. , 1971_a. The effect of temperature variation on the inflammatory response of rainbow trout. *Journal of Path. Bact.* Vol. 105, pp.257-268.
- Finn, J.P. and Nielson, N.O. , 1971_b. The inflammatory response of rainbow trout. *Journal of Fish Biol.* Vol. 3, pp.463-478.
- Halver, J.F. , 1972. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* Vol. 38, No. 1, pp.79-92.
- Hickey, G.M. , 1982. Wound healing in fish larvae. *Journal of Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 57, pp.149-168.
- Jauncey, K. ; Soliman, A. and Roberts, R.J. , 1985. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia (*Oreochromis niloticus* Trewavas). *Aquaculture and fisheries management.* Vol. 16, pp.139-149.
- Kudokotsev, V.P, and Silkima, M.V. , 1967. Regeneration process after amputation of the posterior end of bony fishes. *Biol. Nauk.* Vol. 10, pp.39-42.
- Laird, L.M. ; Roberts, R.J. ; Shearer, W.M. and McArdle, J.F. , 1975. Freeze branding of Juvenile salmon. *Journal of Fish Biol.* Vol. 7, pp.888-999.

- Mawdesley-Thomas, L.E. and Bucke, D. , 1973. Tissue repair in a poikilothermic vertebrate. (*Carassius auratus* L.), a preliminary study. Journal of Fish Biol. Vol. 5, pp.115-119.
- Mittal, A.K. and Munshi, J.S.D. , 1969. Histochemical and autoradiographic studies of skin glands of *Rita rita* (Ham.) (*Bagridae, Pisces*). Mikroskopie. Vol. 24. pp.193-205.
- Mittal, A.K. and Munshi, J.S.D. , 1974. On the regeneration and repair of superficial wounds in the skin of *Rita rita* (Ham.)(*Bagridae: Pisces*). Acta. Anat. Vol. 88, pp.424-442.
- Mittal, A.K. ; Rai, A.K. and Banerjee, T.K. ,1978. Studies on the pattern of healing of wounds in the skin of a catfish (*Heteropneustes fossilis* Bloch), (*Heteropneustidae,Pisces*). Z. Mikrosk-Anat. Forsch. Vol. 91, No. 2, pp.270-286.
- Phromsuthirak, P. , 1977. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. Journal of Fish Biol. Vol. 11, pp.193-206.
- Quilhac, A. and Sire, J.Y. , 1999. Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a Cichlid fish (*Hemichromis bimaculatus*). Anatomical Record (Anat-Rec), Vol.254, No.3, pp.435-451.
- Rai, A.K. and Mittal, A.K. , 1983. Histochemical response of alkaline phosphatase activity during the healing of cutaneous wounds in a catfish. Experientia. Vol. 39, pp.520-522.
- Roberts R.J. , 1975. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: The pathology of Fish. (ed.) W.E. Ribelin & G. Migaki. The

- University of Wisconsin Press. pp.399-428.
- Roberts, R.J. ; Shearer, W.M. ; Elson, K.G.R. and Munro, A.L.S. , 1970.** Studies on ulcerative dermal necrosis.I. The skin of the normal salmon head. Journal of Fish Biol. Vol. 2, pp.223-229.
- Roberts, R.J. ; Ball, H.J. ; Munro, A.L.S and Shearer, W.M. , 1971.** Studies on ulcerative dermal necrosis of salmonids.III. The healing process in fish maintained under experimental condition. Journal of Fish Biol. Vol. 3, pp.221-224.
- Roberts R.J. & Bullock A.M. , 1976.** The dermatology of marine teleost fish.II. Dermatopathology of the integument. Oceanogr.Mar.Biol.Ann.Rev.14,227-246.
- Roberts R.J., MacQueen A., Shearer W.M.& Young H. , 1973.** The histology of salmon tagging.I.The tagging lesion in newly tagged parr.J.Fish Biol.5,497-503.
- Roubal, F.R. and Bullock, A.M. , 1988.** The mechanism of wound repair in the skin of Juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), following hydrocortisone implantation. Journal of Fish Biol. Vol. 32, pp.545-555.
- Sage, M. , 1970.** Control of prolactin release and its role in colour change in teleosts (*Gillichthys mirabilis*). Journal of Exp. Zool. Vol. 173, pp.121-128.
- Saxena, M. and Kulshrestha, S.K. , 1982.** Studies on effect of DDT on the regeneration of cutaneous wounds in *Mystus (Mystus) vittatus* BL. (Bagridae). Acta. Hydrochim. Hydrobiol. Vol. 10, pp.353-360.
- Wagner, G.N. ; Don-Stevens, E. and Harvey-Clark, C. , 1999.** Wound healing in Rainbow trout following surgical site preparation with a Povidin-Iodine

antiseptic. Journal of Aquatic Animal Health. Vol.11, No.4, pp373-382.

Van Oosten, J. , 1957. The skin and scale. *In*: the physiology of fishes. (Ed.) M.E.

Brown. New York, Academic Press. Vol. 1, pp.207-244.